ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

VÕ CHÂU TUẤN, TRẦN QUANG DẦN (đồng chủ biên)

VŨ ĐỨC HOÀNG

GIÁO TRÌNH

CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT

ĐÀ NẴNG - NĂM 2023

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

VÕ CHÂU TUẤN, TRẦN QUANG DẦN (đồng chủ biên)

VŨ ĐỨC HOÀNG

GIÁO TRÌNH

CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT

ĐÀ NẴNG - NĂM 2023

MỤC LỤC

LỜI NÓI ĐẦU **1**

CHƯƠNG 1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC **3**

TÓM TẮT CHƯƠNG **3**

1.1. Một số khái niệm 3

1.1.1. Công nghệ sinh học thực vật 3

1.1.2. Các công nghệ của công nghệ sinh học thực vật 4

1.2. Các nguyên lý cơ sở 6

1.2.1. Tính toàn năng của tế bào 6

1.2.2. Tái tổ hợp DNA 6

1.2.3. Biến nạp di truyền 7

1.3. Các giai đoạn phát triển của công nghệ sinh học thực vật 7

1.3.1. Giai đoạn phát triển nền tảng công nghệ nuôi cấy mô và tế bào 7

1.3.2. Giai đoạn hình thành công nghệ gene thực vật 8

1.3.3. Giai đoạn ứng dụng mạnh mẽ các thành tựu 10

1.4. Các lĩnh vực ứng dụng của công nghệ sinh học thực vật 11

1.4.1. Nông nghiệp 11

1.4.2. Công nghiệp chế biến và năng lượng 12

1.4.3. Sản xuất dược phẩm 13

1.4.4. Bảo tồn nguồn gene thực vật 13

1.4.5. Bảo vệ môi trường 13

1.4.6. Nghiên cứu sinh học thực vật 14

1.5. Xu hướng phát triển của công nghệ sinh học thực vật 14

1.5.1. Phát triển công nghệ nuôi cấy tế bào 14
1.5.2. Ứng dụng của các công nghệ di truyền ở thực vật 15
1.5.3. Phát triển công nghệ mã vạch dựa vào chỉ thị phân tử 15
1.6. Tình hình nghiên cứu và ứng dụng công nghệ sinh học thực vật 15
1.6.1. Phát triển nguồn lực 16
1.6.2. Thành tựu nghiên cứu và ứng dụng 16
1.6.3. Định hướng phát triển đến năm 2030 17
CÂU HỎI ÔN TẬP 18
CHƯƠNG 2. GIỚI THIỆU VỀ NUÔI CẤY MÔ VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT 19
TÓM TẮT CHƯƠNG 19
2.1. Lịch sử phát triển 19
2.2. Cơ sở khoa học của nuôi cấy mô và tế bào thực vật 23
2.3. Một số thuật ngữ trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật 24
2.4. Một số ứng dụng của công nghệ nuôi cấy mô và tế bào thực vật 28
2.4.1. Trong nghiên cứu 28
2.4.2. Trong thực tiễn 28
CÂU HỎI ÔN TẬP 31
CHƯƠNG 3. MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG, ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY MÔ 32
TÓM TẮT CHƯƠNG 32
3.1. Môi trường dinh dưỡng 32
3.1.1. Dinh dưỡng vô cơ 33
3.1.2. Dinh dưỡng hữu cơ 35
3.1.3. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật 41
3.1.4. Tác nhân làm rắn môi trường 45

3.1.5. pH môi trường 46
3.1.6. Một số loại môi trường cơ bản dùng trong nuôi cấy 46
3.2. Các điều kiện nuôi cấy 48
3.2.1. Điều kiện phòng thí nghiệm và các thiết bị nuôi cấy 48
3.2.2. Vô trùng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật 51
3.3. Lựa chọn mô cấy và xử lý mô cấy *in vitro* 58
CÂU HỎI ÔN TẬP 60
CHƯƠNG 4. NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH *IN VITRO* Ở THỰC VẬT 61
TÓM TẮT CHƯƠNG 61
4.1. Mục đích của nhân giống vô tính *in vitro* 61
4.2. Những ưu điểm và hạn chế trong nhân giống vô tính *in vitro* 62
4.2.1. Ưu điểm 62
4.2.2. Hạn chế 63
4.3. Các con đường trong nhân giống vô tính *in vitro* 64
4.3.1. Nhân giống thông qua phát sinh phôi vô tính 64
4.3.2. Tái sinh cây mới từ các cấu trúc sinh dưỡng 66
4.3.3. Nhân giống thông qua callus 71
4.4. Quy trình nhân giống vô tính *in vitro* 72
4.4.1. Giai đoạn chuẩn bị mẫu nuôi cấy 73
4.4.2. Giai đoạn tạo nguyên liệu in vitro khởi đầu 73
4.4.3. Giai đoạn nhân nhanh chồi in vitro 75
4.4.4. Giai đoạn hình thành cây in vitro 76
4.4.5. Giai đoạn huấn luyện cây con ở vườn ươm 77
4.5. Sản xuất cây giống *in vitro* thực vật trong hệ thống phản ứng 79

CÂU HỎI ÔN TẬP **82**

CHƯƠNG 5. NUÔI CẤY TẾ BÀO THỰC VẬT TRONG SẢN XUẤT **83**

TÓM TẮT CHƯƠNG **83**

5.1. Nuôi cấy tế bào thực vật 83

5.1.1. Giới thiệu chung 83

5.1.2. Nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật 84

5.1.3. Đánh giá tốc độ sinh trưởng của tế bào 94

5.1.4. Nuôi cấy tế bào thực vật trong hệ lên men 95

5.2. Sản xuất các hợp chất thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào thực vật 98

5.2.1. Hợp chất thứ cấp ở thực vật 99

5.2.2. Sản xuất các hợp chất thứ cấp ở thực vật 100

5.2.3. Một số giải pháp nâng cao khả năng sản xuất các hợp chất thứ cấp 106

CÂU HỎI ÔN TẬP **108**

CHƯƠNG 6. NUÔI CẤY MÔ VÀ TẾ BÀO TRONG CHỌN TẠO GIỐNG **109**

TÓM TẮT CHƯƠNG **109**

6.1. Chọn tạo dòng biến dị soma 109

6.1.1. Giới thiệu chung 109

6.1.2. Cơ sở khoa học của biến dị soma 110

6.1.3. Các yêu tố ảnh hưởng đến biến dị soma 111

6.1.4. Các phương pháp chọn tạo dòng biến dị soma 112

6.2. Chọn tạo dòng biến dị giao tử 113

6.2.1. Cơ sở khoa học của biến dị giao tử 114

6.2.2. Các kiểu hình thành cây đơn bội in vitro 116

6.2.3. Các bước phát triển phôi của hạt phấn 116

6.2.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy bao phấn 117

6.3. Ứng dụng của dòng biến dị soma và dòng biến dị giao tử trong chọn tạo giống cây trồng 119

CÂU HỎI ÔN TẬP 121

CHƯƠNG 7. BẢO TỒN NGUỒN GENE *IN VITRO* 122

TÓM TẮT CHƯƠNG 122

7.1. Giới thiệu chung về bảo tồn nguồn gene thực vật 122

7.1.1. Bảo tồn nguyên vị 123

7.1.2. Bảo tồn chuyển vị 123

7.1.3. Bảo tồn in vitro 123

7.2. Phương pháp bảo quản ngắn hạn 125

7.2.1. Bảo quản ở điều kiện nhiệt độ thấp 125

7.2.2. Bảo quản trong môi trường thiếu oxy 126

7.2.3. Bảo quản trong điều kiện môi trường không thuận lợi 126

7.3. Phương pháp bảo quản đông lạnh 126

7.3.1. Cơ sở của phương pháp 126

7.3.2. Các phương pháp bảo quản đông lạnh 127

7.3.3. Các bước của quy trình bảo quản đông lạnh 127

CÂU HỎI ÔN TẬP 133

CHƯƠNG 8. VẬT CHẤT DI TRUYỀN VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP 134

TÓM TẮT CHƯƠNG 134

8.1. Các hệ gene ở thực vật 134

8.1.1. Hệ gene nhân 134

8.1.2. Hệ gene bào quan 136

8.2. Cấu trúc và biểu hiện của gene 139

8.2.1. Cấu trúc của gene 139
8.2.2. Biểu hiện gene 140
8.3. Điều hoà biểu hiện gene 141
8.3.1. Điều hoà biểu hiện gene ở mức độ nhiễm sắc thể 141
8.3.2. Điều hoà biểu hiện gene ở mức độ phiên mã 142
8.3.3. Điều hoà biểu hiện gene ở mức độ sau phiên mã 142
8.4. Các phương pháp phân tích acid nucleic 144
8.4.1. Các phương pháp phản ứng khuếch đại DNA 144
8.4.2. Các phương pháp lai phân tử 149
8.4.3. Các phương pháp giải trình tự DNA 152
CÂU HỎI ÔN TẬP 156
CHƯƠNG 9. PHÂN LẬP VÀ TẠO DÒNG GENE 157
TÓM TẮT CHƯƠNG 157
9.1. Thực vật chuyển gene 157
9.2. Các bước cơ bản tạo thực vật chuyển gene 157
9.3. Phân lập gene 159
9.4. Tạo dòng gene 160
9.4.1. Các phương pháp tạo dòng gene 161
9.4.2. Các trình tự cơ bản của vector chuyển gene thực vật 172
9.4.3. Các loại vector chuyển gene thực vật 174
9.4.4. Promoter 178
9.4.5. Các gene chỉ thị 179
9.5. Một số vấn đề lưu ý khi thiết kế vector tái tổ hợp mang gene mục tiêu . 186
9.5.1. Sắp xếp gene 186

9.5.2. Sử dụng codon 186
9.5.3. Các trình tự chức năng tăng cường hiệu quả biểu hiện 187
9.6. Hệ thống chỉnh sửa gene 187
9.6.1. Nguyên lý chung 187
9.6.2. Các loại hệ thống chỉnh sửa gene 188
9.6.3. Hệ thống CRISPR - Cas9 190
9.7. Các tính trạng cần quan tâm trong phát triển cây chuyển gene 193
9.7.1. Chuyển gene tạo cây kháng thuốc diệt cỏ 193
9.7.2. Chuyển gene tạo cây kháng sâu 194
9.7.3. Chuyển gene tạo cây kháng nấm bệnh 194
9.7.4. Chuyển gene tạo cây kháng virus gây bệnh 195
9.7.5. Chuyển gene tạo cây kháng điều kiện ngoại cảnh bất thuận 195
9.7.6. Chuyển gene tạo cây sản xuất những loại protein mới 196
9.7.7. Chuyển gene tạo cây cải thiện chất lượng dinh dưỡng 196
9.7.8. Chuyển gene tạo cây hoa có tính trạng mới 197
9.7.9. Chuyển gene tạo cây làm thức ăn chăn nuôi và nguyên liệu công nghiệp 197
9.7.10. Chuyển gene tạo cây có khả năng xử lí ô nhiễm môi trường 197
CÂU HỎI ÔN TẬP 198
CHƯƠNG 10. CÁC PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GENE 199
TÓM TẮT CHƯƠNG 199
10.1. Chuyển gene ở thực vật 199
10.2. Các phương pháp chuyển gene trực tiếp 200
10.2.2. Phương pháp dội bom 200
10.2.3. Chuyển gene vào protoplast 206

10.2.4. Các phương pháp khác 207
10.3. Chuyển gene thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* 208
10.3.1. Biến nạp vật liệu di truyền vào thực vật của Agrobacterium 208
10.3.2. Các cải tiến ở vi khuẩn Agrobacterium cho mục đích 211
10.3.3. Lây nhiễm Agrobacterium vào mô/tế bào thực vật 213
10.3.4. Chuyển gene in planta 214
10.3.4. Ưu điểm và nhược điểm của phương pháp chuyển gene 215
10.4. Đánh giá kết quả chuyển gene và tái sinh cây chuyển gene 215
10.4.1. Các yếu tố cơ bản ảnh hưởng tới hiệu quả chuyển gene 215
10.4.2. Phân tích sự có mặt của DNA ngoại lai 216
10.4.3. Phân tích biểu hiện của gene chuyển 217
10.4.4. Tái sinh cây chuyển gene 219
CÂU HỎI ÔN TẬP 220
CHƯƠNG 11. ĐÁNH GIÁ THỰC NGHIỆM, ỨNG DỤNG VÀ VẤN ĐỀ 221
TÓM TẮT CHƯƠNG 221
11.1. Đánh giá thực nghiệm cây trồng chuyển gene 221
11.2. Ứng dụng của cây trồng chuyển gene 222
11.2.1. Ứng dụng cải thiện khả năng chống chịu các yếu tố sinh học 224
11.2.2. Ứng dụng cải thiện khả năng kháng stress 227
11.2.4. Ứng dụng cải thiện chất lượng sản phẩm 230
11.3. Vấn đề an toàn sinh học của cây trồng chuyển gene 231
11.3.1. Những câu hỏi đặt ra về an toàn sinh học của cây trồng 232
11.3.2. Các quy định về cây trồng chuyển gene 233
11.3.3. Vấn đề an toàn sinh học của các cây trồng mang tính trạng mới ... 236

11.4. Các quy định và tình hình ứng dụng cây trồng biến đổi gene tại 237
11.4.1. Các quy định liên quan đến cây trồng biến đổi gene 237
11.4.2. Tình hình ứng dụng cây trồng chuyển gene tại Việt Nam 238
CÂU HỎI ÔN TẬP.....240
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....241

LỜI NÓI ĐẦU

Từ đầu thế kỉ XX đến nay, lĩnh vực Công nghệ sinh học đã có những bước phát triển vượt bậc và mang lại những thành tựu có ý nghĩa cho nhân loại. Công nghệ sinh học không chỉ là công cụ nghiên cứu hữu ích trong sinh học mà còn là một công nghệ được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực sản xuất và đời sống. Công nghệ sinh học thực vật là một lĩnh vực của công nghệ sinh học, bao gồm các công nghệ gắn liền với khai thác và ứng dụng các hoạt động của tế bào và phân tử sinh học ở thực vật. Với vai trò quan trọng, hiện nay công nghệ sinh học thực vật đã được đưa vào giảng dạy trong các chương trình đào tạo ngành Công nghệ sinh học ở nhiều trường đại học.

Xuất phát từ nhu cầu học tập của sinh viên hệ cử nhân ngành Công nghệ sinh học nói riêng, cũng như sinh viên các ngành sinh học nói chung, của Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng, tập thể tác giả đã được Nhà trường giao nhiệm vụ biên soạn giáo trình "*Công nghệ sinh học thực vật*". Giáo trình được biên soạn dựa trên mục tiêu, chuẩn đầu ra của học phần tương ứng trong chương trình đào tạo. Do đó, nội dung của giáo trình chỉ tập trung vào hai công nghệ chính là công nghệ nuôi cấy mô tế bào và công nghệ gene thực vật, được cấu trúc gồm 11 chương:

Chương 1 *- Giới thiệu chung về công nghệ sinh học thực vật;*

Chương 2 *– Giới thiệu về nuôi cấy mô và tế bào thực vật;*

Chương 3 *- Môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy mô và tế bào thực vật;*

Chương 4 *- Nhân giống vô tính in vitro ở thực vật;*

Chương 5 *- Nuôi cấy tế bào thực vật trong sản xuất các hợp chất thứ cấp;*

Chương 6 *- Nuôi cấy mô và tế bào trong chọn tạo giống thực vật;*

Chương 7 *- Bảo tồn nguồn gene in vitro;*

Chương 8 *- Vật chất di truyền và các phương pháp phân tích acid nucleic thực vật;*

Chương 9 *- Phân lập và tạo dòng gene;*

Chương 10 *- Các phương pháp chuyển gene;*

Chương 11 *- Đánh giá thực nghiệm, ứng dụng và vấn đề an toàn sinh học cây trồng chuyển gene.*

Qua đây, nhóm tác giả chân thành gửi lời cảm ơn đến các đồng nghiệp đã có những góp ý quý báu trong quá trình biên soạn. Giáo trình được biên soạn lần đầu nên chắc chắn không tránh khỏi những thiếu sót. Rất mong nhận được sự đóng góp ý kiến của bạn đọc để giáo trình ngày càng được hoàn thiện hơn.

Nhóm tác giả

CHƯƠNG 1

GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT

TÓM TẮT CHƯƠNG

Công nghệ sinh học thực vật đã và đang trở thành một bộ phận đóng góp quan trọng vào thành tựu của Công nghệ sinh học, cũng như mang lại những ứng dụng có ý nghĩa trong cuộc sống. Nội dung chương này đề cập đến các khái niệm cơ bản, nguyên lý cơ sở, các công nghệ, lịch sử các giai đoạn phát triển, cũng như vai trò và các ứng dụng của công nghệ sinh học thực vật trong các lĩnh vực khác nhau của đời sống. Qua đó, giúp người học có cái nhìn tổng quan và hệ thống về các vấn đề cơ bản, nhận thức được tầm quan trọng của công nghệ sinh học thực vật.

1.1. Một số khái niệm

1.1.1. Công nghệ sinh học thực vật

Mặc dù các hoạt động ứng dụng mang bản chất công nghệ sinh học đã xuất hiện từ rất lâu, thuật ngữ "Công nghệ sinh học" (Biotechnology) lần đầu tiên được đưa ra vào năm 1919 bởi Karl Ereky - một kỹ sư nông nghiệp người Hungari, với hàm ý "*ứng dụng sinh vật sống để biến các nguyên liệu thô thành sản phẩm hữu ích*" (Fári và cộng sự, 2006). Trải qua hơn một thế kỉ phát triển, công nghệ sinh học đã trở thành một lĩnh vực với nhiều thành tựu nổi bật cả trong nghiên cứu và ứng dụng, đặc biệt đã mang lại ứng dụng thực tiễn có giá trị trong những lĩnh vực như: công nghiệp chế biến, nông nghiệp, y học, năng lượng, vật liệu và môi trường. Với sự phát triển của công nghệ sinh học, các định nghĩa về lĩnh vực này cũng có những thay đổi về phạm vi và đối tượng. Tuy nhiên, một cách tổng quát có thể xem: *Công nghệ sinh học là lĩnh vực khai thác các quá trình sinh học của tế bào hoặc phân tử sinh học kết hợp với kỹ thuật để tạo ra các sản phẩm hữu ích*. Khác với các lĩnh vực sinh học ứng dụng khác, mục tiêu của công nghệ sinh học là biến các tác nhân sinh học, gồm tế bào hoặc các phân tử sinh học (như enzyme, acid nucleic), trở thành công cụ hữu ích dựa trên nền tảng hiểu biết về các quá trình sinh

học của chúng. Các sản phẩm công nghệ sinh học có thể ở dạng vật chất, giải pháp công nghệ, hoặc dịch vụ nhằm giải quyết các vấn đề của cuộc sống. Các tác nhân sinh học có thể được khai thác từ tất các sinh vật sống gồm cả động vật, thực vật và vi sinh vật. Theo đó, khi phân loại dựa vào đối tượng, công nghệ sinh học thực vật được coi là một nhánh của công nghệ sinh học, bên cạnh công nghệ sinh học động vật và vi sinh vật. Như vậy, *công nghệ sinh học thực vật có thể được hiểu là tập hợp các phương pháp, kỹ thuật để biến tế bào và phân tử sinh học thực vật trở thành những công cụ hoặc sản phẩm hữu ích*. Mức độ can thiệp của công nghệ sinh học thực vật chủ yếu là ở cấp độ tế bào hoặc các phân tử sinh học hơn là cá thể. Các công nghệ được phát triển nhờ vào sự hiểu biết về bản chất sinh học của thực vật ở các cấp độ từ cá thể, tế bào, phân tử, kết hợp với sự hỗ trợ của các ngành khoa học và kỹ thuật khác. Những thành tựu tri thức từ các lĩnh vực khoa học sinh học như: sinh học phân tử, sinh học tế bào, sinh lý thực vật, di truyền và vi sinh vật đóng một vai trò nền tảng cho sự phát triển của công nghệ sinh học thực vật.

1.1.2. Các công nghệ của công nghệ sinh học thực vật

Dựa vào bản chất, công nghệ sinh học thực vật bao gồm các công nghệ sau:

❖ ***Công nghệ nuôi cấy mô và tế bào***

Công nghệ này bao gồm các nghiên cứu và ứng dụng các kỹ thuật để nuôi cấy các mô và tế bào thực vật trong điều kiện vô trùng với sự điều khiển quá trình sống của mô và tế bào theo một chủ đích nào đó. Công nghệ nuôi cấy mô và tế bào là công nghệ được ứng dụng sớm và có nhiều thành tựu nổi bật. Nhờ công nghệ nuôi cấy mô và tế bào, nhiều loài cây trồng có giá trị, khó nhân giống bằng các phương thức truyền thống, đã được nhân giống thành công. Bên cạnh đó, các kỹ thuật nuôi cấy tiên tiến cũng đã được ứng dụng như: nuôi cấy đơn bội để tạo dòng thuần, dung hợp tế bào trần (protoplast) tạo tính trạng mới hữu ích, chọn dòng biến dị soma và biến dị giao tử có khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi, sản xuất các cây trồng sạch bệnh, bảo tồn nguồn gene *in vitro*. Các nguyên lý cơ sở, quy trình kỹ thuật và ứng dụng của công nghệ này được đề cập từ **Chương 2** đến **Chương 7**.

❖ ***Công nghệ chỉ thị phân tử***

Chỉ thị phân tử (hay còn gọi là dấu phân tử) là các trình tự DNA đặc hiệu trong hệ gene của sinh vật. Sự hiện diện của các trình tự DNA đặc hiệu này và khoảng cách tương đối giữa chúng phản ánh mức độ khác biệt giữa các cá thể. Do đó, các chỉ thị phân tử được xem là công cụ cực kỳ hiệu quả để nhận biết các cá thể. Các chỉ thị phân tử cho phép phân biệt sự sai khác về cả kiểu gene và kiểu hình giữa các cá thể, qua đó tạo thuận lợi trong việc đánh giá tính đa dạng sinh học, nhận dạng cá thể cũng như chọn tạo giống. Công nghệ chỉ thị phân tử tìm kiếm các trình tự đặc hiệu, phát triển các chỉ thị phân tử thành các công cụ phân biệt sự khác biệt di truyền giữa các cá thể. Các chỉ thị phân tử còn cho phép xác định trực tiếp kiểu gene thông qua việc xác định trình tự của gene hoặc các trình tự liên kết chặt với gene.

Bằng việc phân tích trực tiếp kiểu gene, chỉ thị phân tử khắc phục được những hạn chế của công tác chọn tạo giống dựa vào sự khác biệt kiểu hình. Các phương pháp tiếp cận nhằm tìm kiếm và phát triển các chỉ thị phân tử và kỹ thuật phân tích đang là vấn đề được quan tâm của công nghệ chỉ thị phân. Trong phạm vi của nội dung, giáo trình không đề cập chi tiết về chủ đề này; tuy nhiên, bạn đọc có thể dễ dàng tham khảo ở rất nhiều tài liệu khác.

❖ ***Công nghệ gene thực vật***

Công nghệ gene thực vật (còn gọi là kỹ thuật gene hoặc thao tác gene thực vật) là công nghệ có khả năng làm thay đổi vật chất di truyền của tế bào, qua đó tạo ra tính trạng mới theo chiều hướng mong muốn. Vật chất di truyền của tế bào được thay đổi nhờ vào việc dung hợp các gene ngoại lai vào hệ gene hoặc tiếp nhận các trình tự DNA chức năng có khả năng chỉnh sửa vật chất di truyền của tế bào.

Thay đổi vật chất di truyền ở thực vật bậc cao bằng cách đưa DNA ngoại lai vào trong các tế bào của chúng là một quá trình phức tạp. Tuy nhiên, nhờ vào việc kết hợp các công cụ như: công nghệ nuôi cấy mô và tế bào, công nghệ DNA tái tổ hợp và các kỹ thuật sinh học phân tử đã cho phép quá trình thao tác dễ dàng. Thông tin di truyền được biến nạp vào thực vật không chỉ biểu hiện ở mức độ tế bào và cơ thể mà còn di truyền cho các thế hệ sau. Ngoài việc mở ra triển vọng chuyển các gene có ý nghĩa kinh tế vào cây trồng, biến tế bào thành công cụ đa năng, công nghệ gene thực vật còn là phương tiện quan trọng cho nghiên cứu cấu trúc và hoạt động của gene. Bên cạnh đó,

các vấn đề về an toàn và đạo đức trong hoạt động nghiên cứu và ứng dụng cũng là một vấn đề được các nhà khoa học và quản lí quan tâm. Các nội dung cơ bản liên quan đến công nghệ này được đề cập từ **Chương 8** đến **Chương 11**.

1.2. Các nguyên lý cơ sở

1.2.1. Tính toàn năng của tế bào

Tính toàn năng là khả năng của một tế bào sinh dưỡng phát triển thành một cá thể hoàn chỉnh. Giả thuyết về nguyên lý này được đưa ra dựa trên nền tảng học thuyết tế bào và sau đó đã được chứng minh bằng thực nghiệm. Các tế bào chuyển từ trạng thái tế bào sinh dưỡng sang trạng thái tế bào toàn năng thông qua sự tái thiết chương trình tế bào. Tính toàn năng của tế bào là nền tảng cơ sở của công nghệ nuôi cấy mô và tế bào.

1.2.2. Tái tổ hợp DNA

Sự xuất hiện của hiện tượng tái tổ hợp vật liệu di truyền trong tế bào sinh vật, ví dụ như: trao đổi chéo giữa các đoạn DNA trên các cặp nhiễm sắc thể tương đồng hoặc sự kí sinh của virus trong tế bào vật chủ, là cơ sở để hình thành ý tưởng tạo ra các phân tử DNA tái tổ hợp bằng các kỹ thuật *in vitro*. Công nghệ DNA tái tổ hợp ra đời với mục tiêu ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để tạo ra phân tử DNA tái tổ hợp từ các nguồn di truyền khác nhau. Các phân tử DNA tái tổ hợp được chuyển vào tế bào vật chủ với các mục đích khác nhau như: nghiên cứu chức năng của trình tự DNA, tạo dòng hoặc biểu hiện gene. Các enzyme cắt giới hạn, enzyme nối, enzyme tổng hợp DNA là những công cụ quan trọng được sử dụng để tạo ra phân tử DNA tái tổ hợp.

Công nghệ DNA tái tổ hợp đóng một vai trò rất quan trọng trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật. Nó là công cụ cần thiết cho mục đích thay đổi nhân tạo vật chất di truyền. Một quy trình công nghệ DNA tái tổ hợp dựa trên nền tảng hệ thống enzyme cắt giới hạn và nối bao gồm nhiều bước khác nhau. Hiện nay, công nghệ DNA tái tổ hợp được mở rộng thành kỹ thuật di truyền (genetic engineering) với sự kết hợp của các kỹ thuật phân tử và các hệ thống công cụ phân tử tạo ra sự chính xác và linh hoạt trong quá trình thao tác vật liệu di truyền trong tế bào.

1.2.3. Biến nạp di truyền

Biến nạp di truyền là hiện tượng dung hợp vật chất di truyền ngoại lai và thay đổi bản chất di truyền của tế bào nhận. Sự biến nạp di truyền xảy ra ở sinh vật lần đầu tiên được quan sát ở vi khuẩn bởi Frederick Griffith vào năm 1928. Biến nạp di truyền cũng có khả năng xảy ra ở thực vật, điển hình như quá trình chuyển vật chất di truyền của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* gây nốt sần vào trong tế bào cây họ đậu, hoặc xâm nhiễm của các virus gây bệnh thực vật. Để có thể tiếp nhận vật chất di truyền ngoại lai, các tế bào phải ở trạng thái khả biến. Sự biến nạp di truyền là cơ sở sinh học quan trọng cho thấy khả năng thay đổi di truyền của thực vật. Hiện nay, các vật liệu di truyền có thể được biến nạp vào tế bào bằng nhiều phương pháp khác nhau (xem **Chương 9**).

1.3. Các giai đoạn phát triển của công nghệ sinh học thực vật

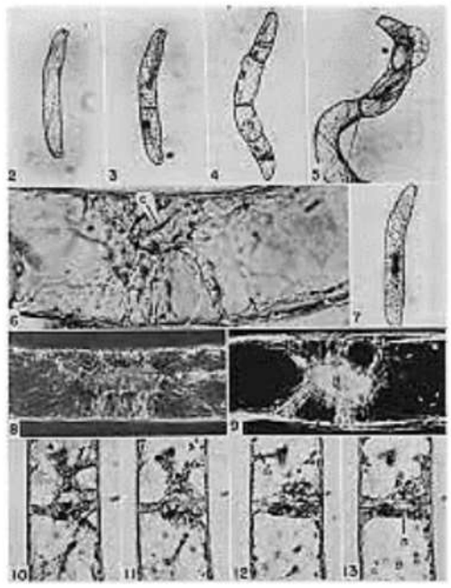
Công nghệ sinh học thực vật chính thức bắt đầu hình thành từ đầu thế kỉ XX. Đến nay, đã trải qua hơn một thế kỉ với những giai đoạn phát triển khác nhau. Dựa vào các thành tựu nổi bật, có thể chia lịch sử phát triển của công nghệ sinh học thực vật thành 03 giai đoạn.

1.3.1. Giai đoạn phát triển nền tảng công nghệ nuôi cấy mô và tế bào

Giai đoạn này kéo dài khoảng 80 năm, bắt đầu từ những năm 1900 đến 1980, với các công trình nghiên cứu nổi bật nhằm chứng minh tính toàn năng của tế bào. Tính toàn năng của tế bào đã được đề cập trong học thuyết tế bào, cũng như một số ý tưởng phân lập và nuôi cấy các mô thực vật với mục đích tái sinh cây đã hình thành từ những năm cuối thế kỉ XIX. Tuy nhiên, các nghiên cứu thực nghiệm chính thức được khởi xướng bởi Haberlandt vào năm 1902 (Vasil, 2008). Mặc dù kết quả vẫn chưa như mong muốn, các mô được nuôi cấy chỉ sinh trưởng mà không có dấu hiệu phân chia tế bào, song Haberlandt vẫn tin tưởng rằng các tế bào sẽ thể hiện tính toàn năng khi được nuôi cấy trong điều kiện thích hợp.

Trong vài thập kỉ sau đó, các nhà khoa học đã tập trung vào việc tìm ra các điều kiện nuôi cấy phù hợp. Các công thức môi trường dinh nuôi cấy mới được phát triển trong giai đoạn 1943 - 1962 đã khắc phục những hạn chế của môi trường dinh dưỡng Knop được sử dụng phổ biến trước đó. Vai trò của các hợp chất phân lập từ thực vật, vi sinh vật hoặc tổng hợp hoá học (còn gọi là chất điều hoà sinh trưởng, protoplast) đối với

các quá trình phát sinh hình thái của tế bào thực vật cũng dần được khám phá. Vào năm 1958 - 1959, hai nhà khoa học Reinert và Steward đã thiết lập hệ thống nuôi cấy cảm ứng thành công các phôi từ các mô sinh dưỡng. Tuy nhiên, các thí nghiệm có tính hệ thống để chứng minh tính toàn năng của tế bào thực sự đã đạt được bởi nhóm nghiên cứu của Hildebrandt vào năm 1965 – 1967 (Vasil, 2008). Một hệ thống buồng vi nuôi cấy "microculture chamber" đã được thiết kế để cảm ứng phôi sinh dưỡng từ các tế bào đơn thuốc lá nuôi cấy ở dạng giọt treo (**Hình 1.1**). Các phôi có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Sự thành công trong việc chứng minh tính toàn năng đã mở ra cơ hội cho sự phát triển của các công nghệ nhân giống *in vitro* và nghiên cứu sinh học thực vật.



Hình 1.1. Sinh trưởng của tế bào sinh dưỡng thuốc lá trong hệ thống buồng vi nuôi cấy (Hildebrandt và cộng sự, 1960).

Bên cạnh các nghiên cứu chứng minh tính toàn năng của tế bào, các kỹ thuật nuôi cấy khác nhau như: nuôi cấy hạt phấn đơn bội; nuôi cấy protoplast, nuôi cấy tế bào đơn cũng đã gặt hái được những thành công bước đầu. Song hành với đó, các công nghệ nuôi cấy sản xuất một số giống cây trồng có giá trị kinh tế cũng đã được ứng dụng trong thực tiễn từ cuối những năm 1970s.

1.3.2. Giai đoạn hình thành công nghệ gene thực vật

Các nghiên cứu công nghệ gene thực sự bắt đầu vào những năm 1970s, khi cơ chế biến nạp vật chất di truyền của vi khuẩn gây nốt sần *Agrobacterium tumefaciens* ở rễ cây họ đậu dần được làm sáng tỏ. Năm 1974, nhóm nghiên cứu của Schell và Zaenen đã

phát hiện sự tồn tại của Ti plasmid trong *Agrobacterium tumefaciens* - một yếu tố mang gene chịu trách nhiệm cho sự hình thành khối u. Vài năm sau đó, một đoạn trình tự đặc biệt trên Ti plasmid được xác định có vai trò chủ đạo trong việc mang vật chất di truyền từ vi khuẩn vào cây. Từ đây, những nỗ lực không ngừng của các nhà khoa học đã làm sáng tỏ cơ chế của quá trình biến nạp, cũng như phát triển Ti plasmid thành một công cụ chuyển gene hiệu quả. Tất nhiên, các thành tựu sinh học phân tử trong giai đoạn này cũng đã đóng góp đắc lực cho việc phát triển công nghệ gene thực vật.

Dấu ấn có tính lịch sử là năm 1983, khi lần đầu tiên cây thuốc lá mang gene kháng kháng sinh đã được tạo ra bởi ba nhóm nghiên cứu do Chilton, Fraley và Schell dẫn đầu. Từ đây, khởi đầu cho một cuộc cách mạng thực sự của công nghệ sinh học thực vật hiện đại. Trong khoảng gần một thập kỉ sau đó, thế giới liên tiếp chứng kiến những thành tựu trong việc chuyển các gene ngoại lai vào các loài cây trồng khác nhau với mục đích cải tiến giống. Hạn chế của việc chuyển gene bằng Agrobacterium là chỉ xảy ra ở cây một lá mầm, trong khi đó nhiều cây trồng có giá trị lại là cây một lá mầm. Cuối những năm 1980s và đầu 1990s, hạn chế này đã được khắc phục với kỹ thuật Agroinfection - sự xâm nhiễm của virus nhờ vào vi khuẩn và sử dụng chất cảm ứng kết hợp với tạo vết thương (Vasil, 2008).

Từ các kết quả nghiên cứu, các cây trồng chuyển gene bắt đầu được ứng dụng vào thực tiễn vào những năm cuối của thế kỉ XX. Năm 1992, cây thuốc lá mang gene kháng bệnh khảm do virus gây ra là cây chuyển gene đầu tiên được cho phép đưa vào thương mại. Sau đó, lần lượt nhiều cây trồng mang các tính trạng ưu việt của gene ngoại lai cũng đã được cho phép thương mại như: cây thuốc lá kháng thuốc diệt cỏ bromoxynil, cây cây cà chua chín chậm, khoai tây kháng sâu, cây đậu nành kháng thuốc diệt cỏ. Đáng chú ý, ở thời gian này các công ty công nghệ sinh học thực vật cũng đã bắt đầu hình thành, tham gia vào nghiên cứu và phát triển cây trồng chuyển gene. Các quy định về an toàn sinh học liên quan đến hoạt động nghiên cứu và ứng dụng cây trồng chuyển gene cũng đã bắt đầu có hiệu lực ở nhiều quốc gia.

Ở giai đoạn này, kỹ thuật dung hợp hai tế bào và chuyển gene trực tiếp vào protoplast bằng các tác nhân hoá lý cũng được phát triển. Vào năm 1970 - 1971, Takebe và cộng sự đã tái sinh cây hoàn chỉnh từ protoplast. Sau đó, các nghiên cứu thành công trong việc chuyển DNA ngoại lai vào protoplast đã dẫn đến những ứng dụng chuyển

gene ở một số đối tượng cây một lá mầm vào đầu những năm 1980s. Đáng chú ý, vào năm 1987, Sanford đã phát triển phương pháp *dội bom*, một phương pháp chuyển gene trực tiếp có hiệu quả (xem **Chương 9**). Phương pháp này đã dần được hoàn thiện sau đó về mặt kĩ thuật và ứng dụng hiệu quả trên nhiều đối tượng khác nhau.

Công nghệ chỉ thị phân tử ở thực vật cũng bắt đầu xuất hiện vào cuối những năm 1980s nhờ vào sự khám phá hệ thống enzyme cắt giới hạn. Chỉ thị đa hình chiều dài đoạn giới hạn là công cụ đầu tiên được ứng dụng để lập bản đồ gene ở cà chua và khoai tây vào năm 1988. Những năm sau đó, các chỉ thị phân tử khác đã được phát triển và ứng dụng như: đa hình DNA khuếch đại ngẫu nhiên, lặp lại trình tự đơn giản bên trong, đa hình chiều dài đoạn khuếch đại và các biến thể của nó, và các chỉ thị gắn liền với đoạn mục tiêu. Các chỉ thị phân tử đã được ứng dụng rộng rãi trong việc thiết lập bản đồ hệ gene, xác định biến dị cá thể, đa dạng quần thể và chọn tạo tạo giống.

1.3.3. Giai đoạn ứng dụng mạnh mẽ các thành tựu của công nghệ sinh học thực vật vào thực tiễn

Các thành tựu nghiên cứu của công nghệ sinh học thực vật bắt đầu ứng dụng mạnh mẽ vào thực tiễn từ đầu thế kỉ XXI cho đến nay. Công nghệ nuôi cấy mô tế bào đã trở thành công nghệ được ứng dụng phổ biến cho nhiều mục đích khác nhau: nhân giống, bảo tồn nguồn gene *in vitro*, sản xuất các hợp chất hoá học, công cụ nghiên cứu sinh học thực vật và phân tử. Các hệ thống nuôi cấy mới được thiết lập để khắc phục hạn chế của các hệ thống nuôi cấy trước đó, đặc biệt là nuôi cấy tế bào (Loyola-Vargas và cộng sự, 2018). Nuôi cấy tế bào đã trở thành công nghệ ứng dụng sản xuất có hiệu quả nhiều hợp chất thức cấp có giá trị (Chandran và cộng sự, 2020).

Công nghệ di truyền cũng bước qua một giai đoạn phát triển ấn tượng. Danh sách các cây trồng chuyển gene được cho phép ứng dụng sản xuất ngày càng tăng lên. Nếu như trong những năm cuối thế kỉ XX, các cây trồng chuyển gene chủ yếu gắn liền với tính trạng năng suất (thế hệ cây trồng chuyển gene thứ nhất) thì ở giai đoạn này các gene cải tiến tính trạng chất lượng và chống chịu với các điều kiện stress (thế hệ cây chuyển gene thứ 2) được quan tâm nhiều hơn. Thực vật không còn là một đối tượng cây trồng nông nghiệp thuần tuý, mà thực sự đã trở thành một nhà máy sản xuất đa năng.

Nhiều kỹ thuật phân tử giúp thao tác, biểu hiện gene trong tế bào thực vật hiệu quả đã được phát triển. Các yếu tố này đã làm cho mục tiêu thay đổi vật liệu di truyền của thực vật trở nên linh hoạt và dễ dàng hơn. Các gene có thể được điều khiển để biểu hiện theo ý muốn (xem **Chương 9**). Biến đổi di truyền không còn giới hạn ở nhân mà có thể thao tác cả đối với hệ gene lục lạp (Clarke và Daniell, 2011; Bock, 2015). Đặc biệt, với cách tiếp cận mới "chỉnh sửa trực tiếp vật liệu truyền" vào đầu những năm 2000s đã khơi mào cho một loạt các nghiên cứu phát triển các công cụ chỉnh sửa gene. Ba hệ thống chỉnh sửa gene nổi bật đã được phát triển gồm: "Zinc-finger nucleases" (ZFNs), "Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) và "Clustered regularly interspaced short palindromic repeats" (CRISPRs) (**Chương 9**). Vào năm 2009, lần đầu tiên hệ thống ZFNs đã được sử dụng để chỉnh sửa hệ gene ở cây thuốc lá và cây ngô (Tröder và Zevnik, 2022). Tuy nhiên, gần đây CRISPR - Cas9, một trong những hệ thống chỉnh sửa gene CRISPR được phát triển bởi các nhà khoa học Doudna và Charpentier vào năm 2012 đã được ứng dụng phổ biến hơn để cải tiến di truyền ở cây trồng (Liu và cộng sự, 2021). Ứng dụng hệ thống CRISPR - Cas9 để chỉnh sửa hệ gene đã trở thành điểm nổi bật trong giai đoạn này.

Công nghệ chỉ thị phân tử cũng có những bước tiến vượt bậc ở giai đoạn đầu thế kỉ XXI. Ngoài các chỉ thị phân tử thế hệ đầu tiên (dựa vào enzyme cắt giới hạn và phản ứng khuếch đại) như: RFLP, RAPD, SSR và AFLP, các chỉ thị phân tử thuộc thế hệ thứ hai (dựa vào trình tự) đã được phát triển như: SNP, KASper, DArT và GBS (Lateef, 2015). Ứng dụng các chỉ thị vào nghiên cứu đa dạng di truyền và lai tạo giống đã trở nên phổ biến.

1.4. Các lĩnh vực ứng dụng của công nghệ sinh học thực vật

1.4.1. Nông nghiệp

Trồng trọt là một trong những lĩnh vực sản xuất chính cho nhu cầu thực phẩm của con người. Với dự đoán dân số thế giới tăng, dự kiến khoảng 9,7 tỷ người vào năm 2050, nhu cầu lương thực sẽ tăng 58 - 98% (Ranjan và cộng sự, 2017). Sự gia tăng nhiệt độ trái đất, hạn hán, lũ lụt, dịch bệnh diễn biến ngày càng phức tạp cũng là vấn đề đáng lo ngại. Điều này đặt ra thách thức rất lớn đối với ngành nông nghiệp, và có thể đe doạ đến an ninh lương thực ở nhiều quốc gia. Bên cạnh đó, con người ngày càng quan tâm đến

chất lượng thực phẩm, nhu cầu về những thực phẩm tốt cho sức khỏe ngày càng tăng. Do đó, công nghệ sinh học thực vật sẽ đóng vai trò then chốt, góp phần giải quyết các vấn đề về phương pháp sản xuất giống, chất lượng giống để nâng cao năng suất sản xuất nông nghiệp.

1.4.1.1. Cải tiến phương pháp sản xuất giống

Các phương pháp nhân giống truyền thống như: ghép cành, chiết cành và giâm cành có thể được thay thế hiệu quả bởi công nghệ nhân giống *in vitro*. Đặc biệt là đối với những đối tượng khó thực hiện bằng phương pháp truyền thống (xem **Chương 4**).

1.4.1.2. Cải thiện giống

Cải thiện giống là khâu then chốt để đảm bảo nâng cao năng suất và duy trì sản xuất nông nghiệp bền vững. Để làm được điều này, ngoài phương pháp lai tạo truyền thống thì việc tạo ra các cây trồng mang tính trạng ưu thế là điều cần thiết. Công nghệ chỉ thị phân tử và nuôi cây mô tế bào sẽ là những công cụ hỗ trợ đắc lực cho chọn tạo giống mới. Trong khi đó, công nghệ gene sẽ trở thành một công cụ không thể thiếu trong việc tạo ra các tính trạng ưu thế mới, vốn không tồn tại ở thực vật. Đáng chú ý là các tính trạng gắn liền với mục tiêu nâng cao năng suất và chất lượng nông sản (xem **Chương 9**).

1.4.2. Công nghiệp chế biến và năng lượng

Thực vật cung cấp nguồn nguyên liệu dồi dào và giá trị cho nhiều ngành sản xuất công nghiệp, đặc biệt là công nghiệp năng lượng và chế biến. Theo đó, công nghệ sinh học thực vật góp phần phát triển nguồn nguyên liệu cho sản xuất công nghiệp theo hai hướng sau:

- Một là, tạo ra nguồn nguyên liệu dồi dào hoặc nguyên liệu mới, ví dụ nguồn nguyên liệu cellulose cho ngành công nghiệp chế biến gỗ, nguyên liệu cho sản xuất nhiên liệu sinh học (Li và cộng sự, 2014);

- Hai là, tạo ra quy trình sản xuất mới mà trong đó tế bào hoặc các thành phần của chúng trở thành yếu tố chất xúc có hiệu quả cho các quá trình sản xuất (Miflin, 1992).

1.4.3. Sản xuất dược phẩm

Thực vật là nguồn đa dạng và dồi dào các hợp chất có giá trị y học và có lợi cho khoẻ con người. Do đó, công nghệ sinh học thực vật trở thành công cụ quan trọng để khai thác nguồn dược chất này, góp phần thúc đẩy sự phát triển của ngành sản xuất dược phẩm. Công nghệ sản xuất dược phẩm bằng con đường thực vật được tiếp cận theo các hướng:

- Một là, khai thác các dược chất mới có giá trị y học từ thực vật;

- Hai là, tăng sự tích luỹ cao hoặc hoạt tính các dược chất ở trong tế bào thực vật nhờ vào các công nghệ nuôi cấy hoặc thay đổi con đường chuyển hoá bằng công nghệ gene;

- Ba là, sử dụng tế bào thực vật làm nhà máy gia công các sản phẩm mục tiêu với nguồn nguyên liệu đầu vào, ví dụ: sản xuất các vaccine tái tổ hợp của virus, kháng thể người,…

1.4.4. Bảo tồn nguồn gene thực vật

Đa dạng nguồn tài nguyên thực vật có xu hướng ngày càng giảm với tác động của biến đổi khí hậu và hoạt động sống của con người. Nhiều nguồn gene quý đang và sẽ đứng trước nguy cơ tuyệt chủng. Bên cạnh các giải pháp bảo tồn truyền thống, bảo tồn *in vitro* đã trở thành giải pháp hữu ích giúp cho việc gìn giữ các nguồn gene an toàn hơn. Chỉ thị phân tử cũng mang lại ý nghĩa thực tiễn công tác bảo tồn.

1.4.5. Bảo vệ môi trường

Thực vật có khả năng hấp thu và chuyển hoá các chất gây ô nhiễm môi trường, đặc biệt là chuyển hoá các chất ô nhiễm vô cơ. Do đó, ứng dụng các loài thực vật xử lí môi trường là một chủ đề được quan tâm từ rất lâu. Nhiều loài thực vật đã được ứng dụng để xử lí môi trường nước và đất. Tuy nhiên, đòi hỏi phát triển các loài thực vật có khả năng hấp thụ và chuyển hoá các chất ô nhiễm ở một ngưỡng và hiệu quả cao hơn vẫn là vấn đề thách thức. Rõ ràng, công nghệ gene sẽ là công cụ tiềm năng để giải quyết bài toán này một khi cơ chế hấp thụ chất ô nhiễm ở thực vật được làm rõ.

1.4.6. Nghiên cứu sinh học thực vật

Ngoài những sản phẩm ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau của cuộc sống, công nghệ sinh học thực vật còn cung cấp các công cụ hữu ích trong nghiên cứu sinh học thực vật, như nghiên cứu đa dạng di truyền, sinh lý, phân tử và genomics. Ví dụ, công nghệ nuôi cấy mô tế bào có thể tạo ra hệ thống nuôi cấy hữu ích cho các nghiên cứu sinh lý thực vật hoặc chức năng gene.

1.5. Xu hướng phát triển của công nghệ sinh học thực vật

Công nghệ sinh học thực vật đã mang lại ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác nhau, với những thành tựu nổi bật trong hơn một thế kỉ vừa qua. Công nghệ nuôi cấy mô tế bào đã trở thành công cụ chính trong sản xuất giống cây trồng cũng như bảo tồn các nguồn gene quý. Công nghệ chuyển gene cũng đã cho thấy vai trò quan trọng đối với cải tiến cây trồng. Các chỉ thị phân tử cũng ý nghĩa to lớn cho việc chọn tạo các giống cây trồng. Trong tương lai gần, các công nghệ sinh học thực vật vẫn sẽ tiếp tục phát triển theo xu hướng giải quyết các hạn chế của các công nghệ hiện có và khai thác các công nghệ tiềm năng.

1.5.1. Phát triển công nghệ nuôi cấy tế bào

Các nghiên cứu và ứng dụng của công nghệ nuôi cấy mô tế bào sẽ phát triển theo các xu hướng sau:

- Hoàn thiện các công nghệ nuôi cấy hiện có với tính tự động và hiệu quả cao hơn cũng như phát triển các kỹ thuật, công nghệ nuôi cấy mới. Thành tựu mới của các lĩnh vực kỹ thuật như công nghệ nano và công nghệ thông tin có khả năng trở thành những công cụ hữu ích để đạt được mục tiêu;

- Mở rộng nghiên cứu và ứng dụng nuôi cấy mô tế bào ở nhiều đối tượng thực vật, đặc biệt gắn liền với các đối tượng cần bảo tồn;

- Thiết lập các hệ thống nuôi cấy tế bào gắn liền với kỹ thuật chuyển hoá để sản xuất các hợp chất có giá trị y học;

- Ứng dụng các công cụ biến đổi di truyền trong việc thay đổi con đường chuyển hoá của tế bào để sản xuất các sản phẩm có giá trị.

1.5.2. Ứng dụng của các công nghệ di truyền ở thực vật

Phát triển các công nghệ di truyền và ứng dụng nó để thay đổi tính trạng của cây trồng vẫn là chủ đề quan tâm trong thời gian tới. Các vấn đề cần giải quyết trước mắt để mang lại hiệu quả hơn trong thực tiễn gồm:

- Biểu hiện có hiệu quả nhiều gene cho nhiều tính trạng khác nhau trong một đối tượng cây trồng;

- Tạo công nghệ kháng virus với phổ rộng để kháng lại hiện tượng biến chủng của virus gây bệnh ở cây trồng;

- Khắc phục các vấn đề về biểu hiện gene như loại bỏ hiện tượng bất hoạt gene chuyển, mức độ biểu hiện thấp;

- Ứng dụng hệ thống chỉnh sửa hệ gene CRISPRs-Cas để tạo ra các cây trồng biến đổi gene;

- Tạo ra các loại cây trồng với nhóm tính trạng nâng cao chất lượng và sức chố

Nhận thấy tầm quan trọng có tính chiến lược của công nghệ sinh học thực vật trong phát triển sản xuất nông nghiệp, Chính phủ đã ban hành nhiều chủ trương thúc đẩy mạnh hoạt động nghiên cứu và ứng dụng trong lĩnh vực này. Ban Bí thư đã ban hành Chỉ thị số 50 CT/TW ngày 4/3/2005 về việc đẩy mạnh phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học phục vụ sự nghiệp công nghiệp hóa, hiện đại hóa đất nước. Sau gần 50 năm, công nghệ sinh học thực vật ở Việt Nam đã có những bước phát triển đáng ghi nhận trong việc phát triển nguồn lực và thành tựu nghiên cứu và ứng dụng.

1.6.1. Phát triển nguồn lực

Đội ngũ các nhà khoa học và nguồn nhân lực phục vụ được đào tạo bài bản từ các nước phát triển và tăng nhanh về số lượng so với trước đây. Các cơ sở đào tào, nghiên cứu và ứng dụng có sự thay đổi lớn cả về số lượng và quy mô với các trang thiết bị tương đối hiện đại. Các nhà khoa học Việt Nam đã có thể làm chủ các công nghệ tiên tiến hiện nay.

1.6.2. Thành tựu nghiên cứu và ứng dụng

Công nghệ nuôi cấy mô tế bào được coi là công nghệ có nhiều thành tựu nhất, với những nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong nhân nhanh các giống cây trồng như hoa, cây cảnh, cây lâm nghiệp, cây thuốc, và bảo tồn nhiều nguồn gene dược liệu quý hiếm. Thống kê cho thấy có trên 100 phòng thí nghiệm sử dụng kĩ thuật này và đã sản xuất gần 30 triệu cây giống vô tính (Dương Tấn Nhựt và Hoàng Xuân Chiến, 2012). Một số hệ thống nuôi cấy cải tiến và kỹ thuật mới cũng đã được thiết lập cho nhiều mục đích khác nhau, ví dụ kỹ thuật nuôi cấy lát cắt mỏng, ứng dụng đèn LED trong nhân giống *in vitro* (Dương Tấn Nhựt, 2011). Đối với công nghệ di truyền, các thành tựu đạt được chủ yếu là trong hoạt động nghiên cứu, các ứng dụng vẫn còn hạn chế. Nhiều chỉ thị phân tử có giá trị đã được phát triển để phục vụ cho việc lai tạo giống ở một số cây trồng, cũng như đánh giá tính đa dạng, xây dựng chỉ thị phân tử đặc trưng cho các nguồn gene thực vật có giá trị. Trong khi đó, công nghệ gene thực vật vẫn đang còn ở giai đoạn nghiên cứu. Các nghiên cứu chủ yếu phát triển kỹ thuật hoặc ứng dụng làm công cụ cho nghiên cứu sinh học phân tử thực vật.

1.6.3. Định hướng phát triển đến năm 2030

Các quyết định có ảnh hưởng trực tiếp đến phát triển công nghệ sinh học thực vật tại Việt Nam đến năm 2030 phải kể đến như: Định hướng xây dựng chính sách phát triển công nghiệp quốc gia đến năm 2030, tầm nhìn đến năm 2045 (Nghị quyết số 23-NQ/TW ngày 22 tháng 3 năm 2018 của Ban Chấp hành Trung ương Đảng); Kế hoạch tổng thể phát triển công nghiệp sinh học đến năm 2030 (Quyết định số 553/QĐ-TTg ngày 21 tháng 4 năm 2017 của Thủ tướng Chính phủ). Các văn bản này đã chỉ ra định hướng phát triển tổng thể công nghệ sinh học thông qua việc tập trung nguồn lực đầu tư phát triển, đổi mới cơ chế chính sách, tranh thủ hợp tác và hỗ trợ quốc tế, tạo điều kiện thuận lợi để doanh nghiệp đầu tư và sản xuất sản phẩm từ công nghệ sinh học trong các ngành, lĩnh vực và trở thành một ngành kinh tế - kỹ thuật quan trọng.

CÂU HỎI ÔN TẬP

Câu 1: Trình bày khái niệm và phạm vi đối tượng của công nghệ sinh học thực vật ?

Câu 2: Giải thích nội dung của 03 công nghệ chính của công nghệ sinh học ?

Câu 3: Trình bày đặc điểm chính của các giai đoạn phát triển của công nghệ sinh học thực vật ?

Câu 4: Giải thích vai trò của các quá trình sinh học cơ sở: tính toàn năng, tái tổ hợp DNA và biến nạp di truyền đối với sự hình thành công nghệ sinh học thực vật ?

Câu 5: Tại sao nói công nghệ DNA tái tổ hợp là công cụ quan trọng cho sự phát triển của công nghệ sinh học thực vật ?

Câu 6: Trình bày các lĩnh vực ứng dụng của công nghệ sinh học thực vật ? Tại sao nói công nghệ sinh học thực vật có vai trò quan trọng đối với nông nghiệp ?

Câu 7: Phân tích các xu hướng phát triển trong tương lai của công nghệ sinh học thực vật ?

CHƯƠNG 2

GIỚI THIỆU VỀ NUÔI CẤY MÔ VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT

TÓM TẮT CHƯƠNG

Nuôi cấy mô và tế bào thực vật là một công cụ quan trọng cả trong nghiên cứu cơ bản và thương mại hóa các sản phẩm ở thực vật. Nghiên cứu khởi đầu của Haberlandt (1902) đã đưa đến nuôi cấy rễ, phôi và nuôi cấy mô thực vật đầu tiên trong thực tiễn. Nuôi cấy mô thực vật thực sự bắt đầu vào năm 1934 khi Gautheret thử nghiệm nuôi cấy tế bào tách rời và rễ thực vật trên môi trường nuôi cấy có hệ thống. Những năm 1940s đến 1960s, đánh dấu sự phát triển của các kỹ thuật mới và cải tiến các kỹ thuật trước đó. Hơn 50 năm sau, các nhà thực nghiệm sinh học về nuôi cấy mô và tế bào thực vật mới đạt được thành tựu chứng minh cho khả năng tồn tại và phát triển độc lập của tế bào, tính toàn thể của tế bào thực vật. Nuôi cấy tế bào thực vật đã được ghi nhận là một công cụ quan trọng trong nghiên cứu cơ bản của sinh học, hóa sinh học và có vai trò quan trọng chính trong nghiên cứu sinh học phân tử và công nghệ sinh học nông nghiệp. Đến nay, nuôi cấy mô và tế bào thực vật đang bước vào giai đoạn phát triển mạnh cả trong nghiên cứu và ứng dụng.

2.1. Lịch sử phát triển

Nuôi cấy mô và tế bào thực vật là nuôi cấy vô trùng các tế bào, mô, cơ quan và các bộ phận của chúng dưới các điều kiện *in vitro* về vật lý và hóa học (Loyola-Vargas và Vázquez-Flota, 2006). Nuôi cấy mô và tế bào thực vật là một công cụ quan trọng cả trong nghiên cứu cơ bản, ứng dụng và thương mại hóa các sản phẩm ở thực vật.

Bắt đầu từ ý tưởng của nhà khoa học người Đức, Haberlandt, vào đầu thế kỷ XX, nghiên cứu khởi đầu này đưa đến nuôi cấy rễ, phôi và nuôi cấy mô thực vật đầu tiên trong thực tiễn. Giai đoạn giữa những năm 1940 đến những năm 1960 được đánh dấu bởi sự phát triển của các kỹ thuật mới và cải tiến các kỹ thuật nuôi cấy trước đó. Những năm 1990, tiếp tục phát triển ứng dụng các kỹ thuật *in vitro* để tăng số lượng các loài thực vật. Nuôi cấy tế bào thực vật đã được ghi nhận là một công cụ quan trọng trong

nghiên cứu những lĩnh vực cơ bản của sinh học, hóa sinh học và đã được công nhận có tầm quan trọng chính trong nghiên cứu sinh học phân tử và công nghệ sinh học nông nghiệp. Lịch sử phát triển của công nghệ nuôi cấy mô và tế bào thực vật được tóm tắt qua các mốc thời gian như sau:

- Năm 1902, Haberlandt lần đầu tiên thí nghiệm nuôi cấy mô cây một lá mầm nhưng không thành công.

- Năm 1934, Kogl lần đầu tiên xác định được vai trò của IAA, một hoocmon thực vật đầu tiên thuộc nhóm auxin có khả năng kích thích sự tăng trưởng và phân chia tế bào.

- Năm 1939, 3 nhà khoa học Gautheret, Nobecourt và White đã đồng thời nuôi cấy mô sẹo (callus) thành công trong thời gian dài từ mô thượng tầng ở cà rốt và thuốc lá, callus có khả năng sinh trưởng liên tục.

- Năm 1941, Overbeek và cs đã sử dụng nước dừa trong nuôi cấy phôi non ở cây cà rốt *Datura*.

- Năm 1949, Limmasets và Cornuet đã phát hiện rằng virus phân bố không đồng nhất trên cây và thường không thấy có virus ở vùng đỉnh sinh trưởng.

- Năm 1952, Morel và Martin đã tạo ra cây sạch bệnh virus của 6 giống khoai tây từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Ngày nay, kỹ thuật này với một số cải tiến đã trở thành phương pháp loại trừ bệnh virus được dùng rộng rãi đối với nhiều loài cây trồng khác nhau. Morel và Martin lần đầu tiên thực hiện vi ghép in vitro thành công. Kỹ thuật vi ghép sau đó đã được ứng dụng rộng rãi trong tạo nguồn giống sạch bệnh virus và tương tự virus ở nhiều cây trồng nhân giống bằng phương pháp vô tính khác nhau, đặc biệt là tạo giống cây ăn quả sạch bệnh.

- Năm 1955, Miller và cs đã phát minh cấu trúc và sinh tổng hợp của kinetin - một cytokinin đóng vai trò quan trọng trong phân bào và phân hóa chồi ở mô nuôi cấy.

- Năm 1957, Skoog và Miller đã khám phá vai trò của tỷ lệ nồng độ các chất auxin: cytokinin trong môi trường đối với sự phát sinh cơ quan (rễ hoặc chồi). Khi tỷ lệ auxin/ cytokinin (ví dụ: nồng độ IAA/ nồng độ kinetin) nhỏ hơn 1 và càng nhỏ, mô có xu hướng tạo chồi. Ngược lại khi nồng độ IAA/ nồng độ kinetin lớn hơn 1 và càng lớn, mô có xu

hướng tạo rễ. Tỷ lệ nồng độ auxin và cytokinin thích hợp sẽ kích thích phân hoá cả chồi và rễ, tạo cây hoàn chỉnh.

- Năm 1959, Tulecke và Nickell đã thử nghiệm sản xuất sinh khối mô thực vật quy mô lớn (134 lít) bằng nuôi cấy chìm.

- Năm 1960, Morel đã thực hiện bước ngoặt cách mạng trong sử dụng kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng trong nhân nhanh các loại địa lan *Cymbidium*, mở đầu công nghiệp vi nhân giống thực vật. Cocking lần đầu tiên sử dụng enzym phân giải thành tế bào và đã tạo ra số lượng lớn protoplast. Kỹ thuật này sau đó đã được hoàn thiện để tách nuôi protoplast ở nhiều cây trồng khác nhau.

- Năm 1964, Guha và Maheshwari lần đầu tiên thành công trong tạo được cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn của cây cà *Datura*. Kỹ thuật này sau đó đã được nhiều tác giả phát triển và ứng dụng rộng rãi trong tạo dòng đơn bội (1x), dòng thuần nhị bội kép (2x), cố định ưu thế lai (nuôi cấy bao phấn hoặc hạt phấn của dòng lai F1 để tạo giống thuần mang tính trạng ưu thế lai).

- Năm 1971, Takebe và cs đã tái sinh được cây từ protoplast mô thịt lá ở thuốc lá.

- Năm 1972, Carlson và cs lần đầu tiên thực hiện lai tế bào sôma giữa các loài, tạo được cây từ dung hợp protoplast của 2 loài thuốc lá *Nicotiana glauca* và *N. langsdorfii.*

- Năm 1974, Zaenen và cs đã phát hiện plasmid Ti đóng vai trò là yếu tố gây u ở cây trồng.

- Năm 1977, Noguchi và cs đã nuôi cấy tế bào thuốc lá trong bioreactor dung tích lớn 20.000 lít.

- Năm 1978, Melchers và cs tạo được cây lai soma "Cà chua thuốc lá" bằng lai xa protoplast của 2 cây này. Đến nay, việc tái sinh cây hoàn chỉnh từ protoplast hoặc từ lai protoplast đã thành công ở nhiều loài thực vật. 6 Công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật

- Năm 1978, Tabata và cs đã nuôi tế bào cây thuốc ở quy mô công nghiệp phục vụ sản xuất shikonin. Họ đã chọn lọc được dòng tế bào cho sản lượng các sản phẩm thứ cấp (shikonin) cao hơn.

- Năm 1979, Marton và cs đã xây dựng quy trình chuyển gene vào protoplast bằng đồng nuôi cấy protoplast và *Agrobacterium*.

- Năm 1981, trên cơ sở quan sát các biến dị xảy ra rất phổ biến trong nuôi cấy mô và tế bào với phổ biến dị và tần số biến dị cao, Larkin và Scowcroft đã đưa ra thuật ngữ "biến dị dòng soma" để chỉ các thay đổi di truyền tính trạng xảy ra do nuôi cấy mô và tế bào *in vitro*. Từ các dòng tế bào hoặc cây biến dị di truyền ổn định có thể nhân nhanh, tạo ra các dòng và giống đột biến có năng suất, hàm lượng hoạt chất hữu ích cao, kháng một số các điều kiện bất lợi như bệnh, mặn, hạn…

- Năm 1985, Flores và Filner lần đầu tiên sản xuất chất trao đổi thứ cấp từ nhân nuôi rễ tơ ở cây *Hyoscyamus muticus*. những rễ này sản xuất nhiều hoạt chất hyoscyamine hơn cây tự nhiên. Hiện nay, công nghệ nuôi cấy tế bào và mô trong các bioreactor dung tích lớn đã được thương mại hoá ở mức công nghiệp để sản xuất sinh dược.

- Năm 1986, Hamill và cs đã thiết lập các môi trường nuôi cấy rễ tơ của *Beta vulgaris* và *Nicotinna rustica* sau khi lây nhiễm *Agrobacterium rhizogenes* và đã tổng hợp các sản phẩm thứ cấp đặc trưng của chúng ở mức có thể tương đương với các sản phẩm của rễ tự nhiên.

- Năm 1988, Nomoru và cs đã sử dụng các tế bào đơn của cà rốt từ dịch huyền phù tế bào t để vi tiêm và các tế bào cà rốt được vi tiêm có thể phân chia và biệt hóa thành phôi với tần suất khoảng 50%.

- Năm 1990, Milanova và cs đã thành công trong việc khắc phục tính không tương thích trong lai giữa *Nicotiana africana* và *N. tabacum* và tạo ra cây bất dục bằng cách nuôi cấy phôi.

- Năm 1994, thương mại hóa giống cà chua chuyển gene 'FlavrSavr' nuôi cấy in vitro

Lịch sử nuôi cấy mô thực vật bắt đầu thực sự vào năm 1934 khi Gautheret thử nghiệm nuôi cấy tế bào tách rời và rễ thực vật trên môi trường nuôi cấy có hệ thống. Những ảnh hưởng có tính tiên phong này đã mở ra các nghiên cứu xoay quanh nó. Sau chiến tranh Thế Giới thứ II, các nhà nghiên cứu bệnh học thực vật người Mỹ đã bắt đầu quan tâm nhiều đến nuôi cấy mô thực vật. Năm 1979, Steward đã chỉ ra rằng, công nghệ nuôi cấy mô thực vật là "Cuộc cách mạng thầm lặng trong nông nghiệp" đang có nhiều tiềm năng để hỗ trợ phương pháp nhân giống truyền thống. Đến nay, nuôi cấy mô và tế

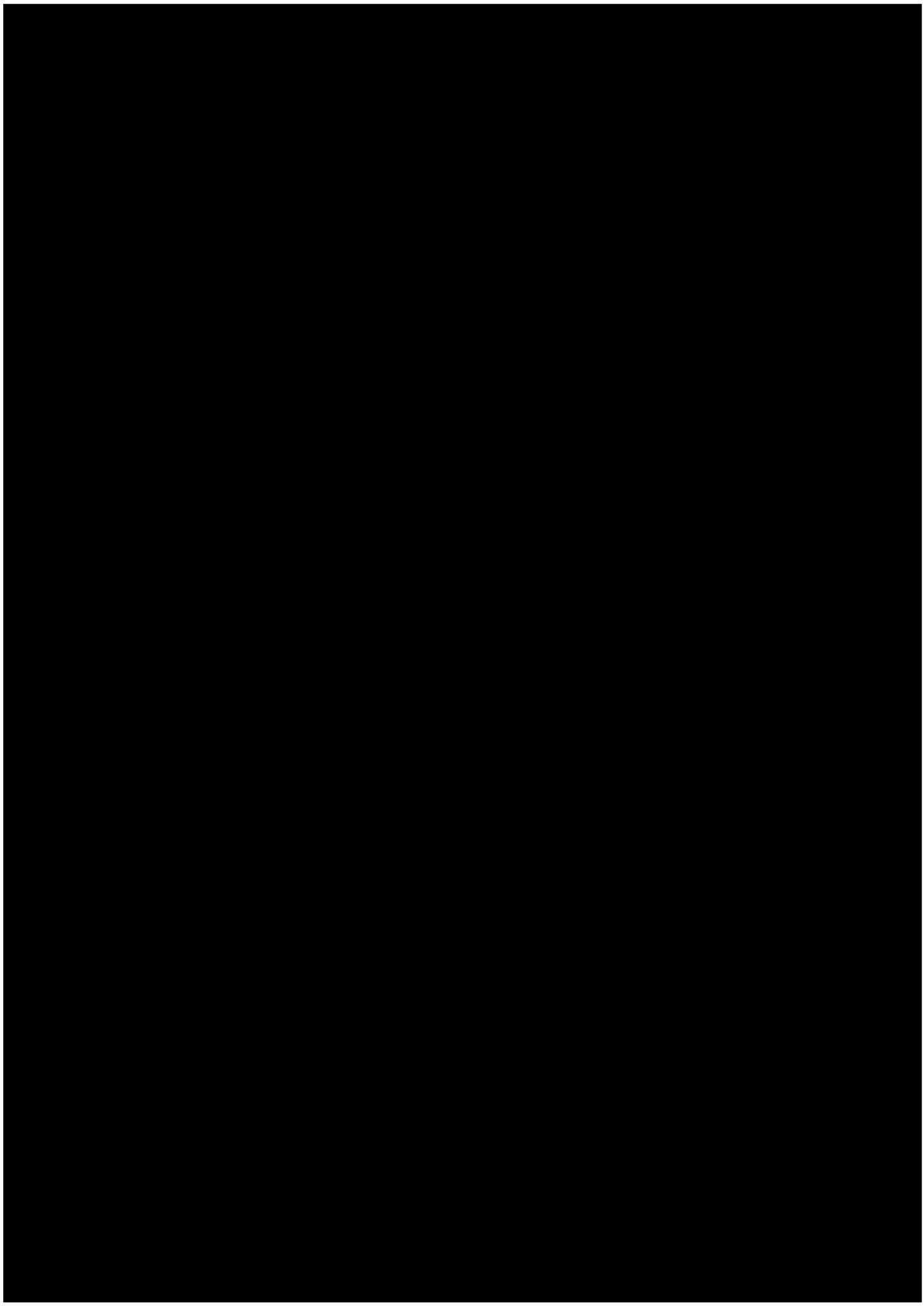
bào thực vật đang bước vào giai đoạn phát triển mạnh cả trong nghiên cứu và ứng dụng. Nuôi cấy mô thực vật được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất như nhân giống, chọn tạo giống cây trồng, nuôi cấy sinh khối tế bào, sản xuất các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học. Công nghệ thực vật nói chung và nuôi cấy, tế bào thực vật nói riêng đang trở thành công cụ có hiệu quả cao trong việc sản xuất các sản phẩm đặc trưng phục vụ con người.

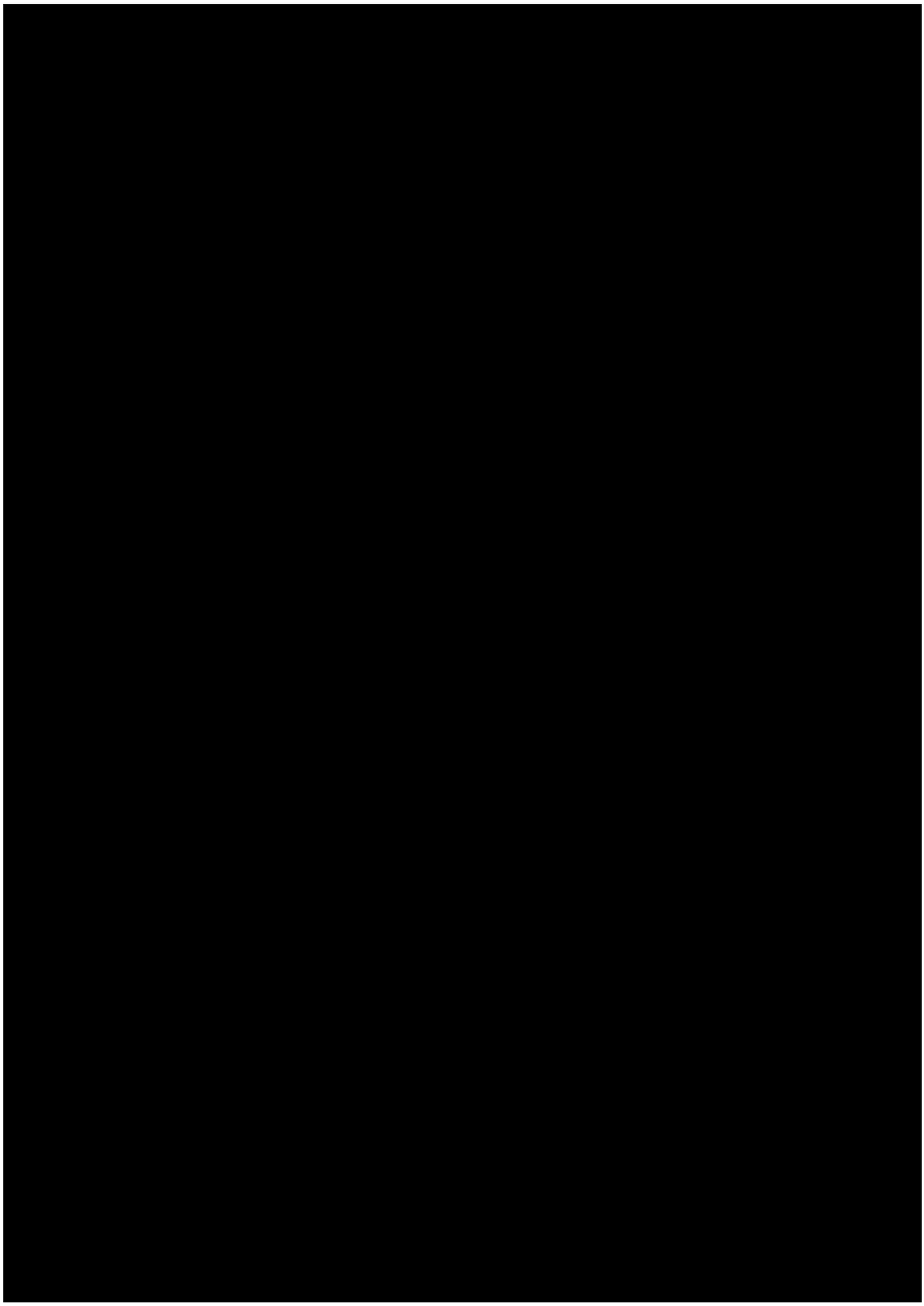
2.2. Cơ sở khoa học của nuôi cấy mô và tế bào thực vật

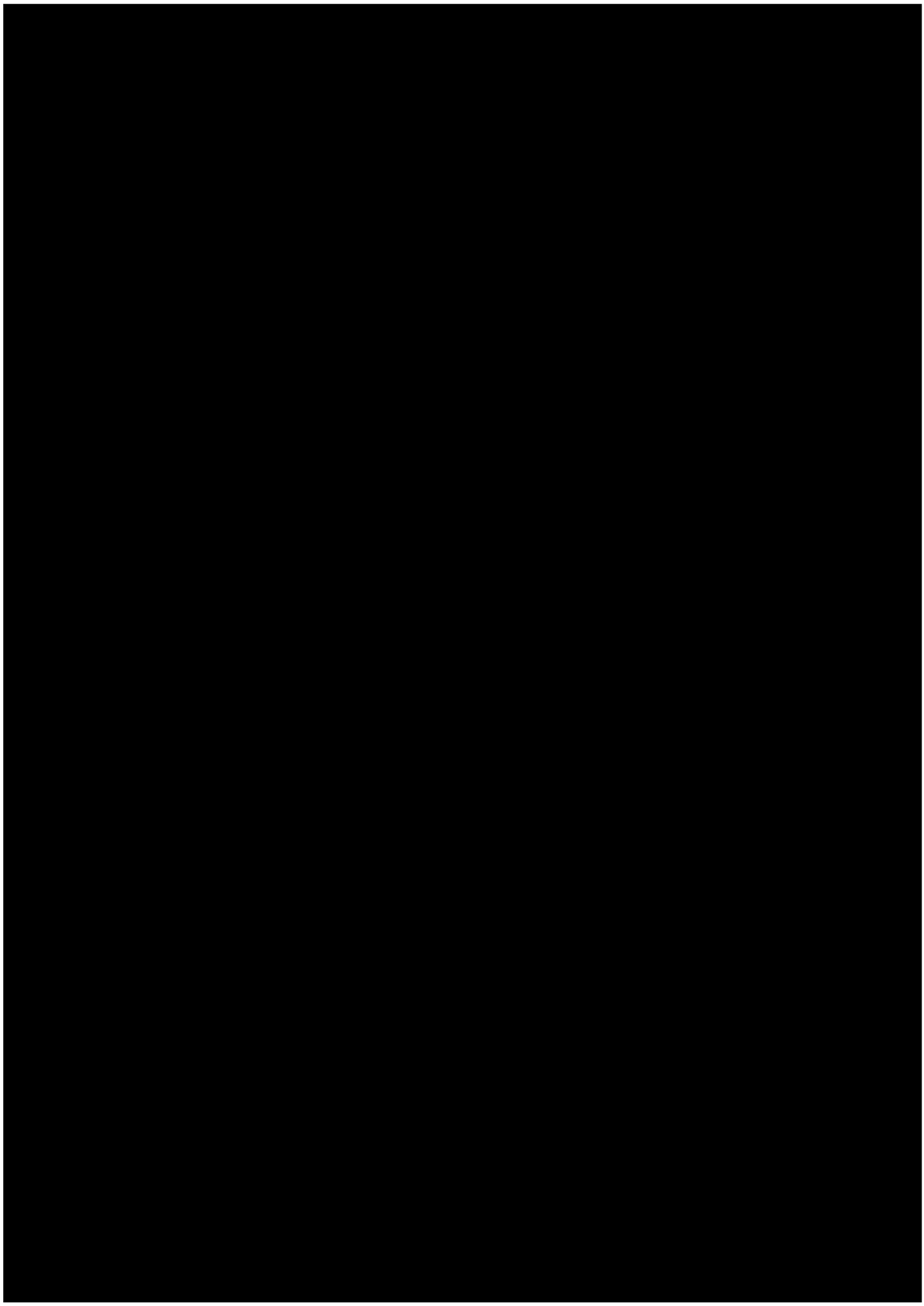
Năm 1662, Robert Hooke đã thiết kế kính hiển vi đơn giản đầu tiên và quan sát được cấu trúc của miếng bấc bần bao gồm nhiều hạt nhỏ, ông gọi các hạt nhỏ đó là tế bào. Năm 1675, Leeuwenhoek xác nhận cơ thể động vật cũng bao gồm các tế bào. Ông quan sát dưới kính hiển vi thấy máu động vật có chứa các hồng cầu và ông gọi đó là các tế bào máu. Nhưng mãi đến năm 1838, Schleiden và 1839, Schwann mới chính thức xây dựng học thuyết tế bào. Schleiden và Schwann khẳng định rằng: mỗi cơ thể động thực vật đều bao gồm những thể tồn tại hoàn toàn độc lập, riêng rẽ và tách biệt, đó chính là tế bào. Có thể nói Schleiden và Schwann là hai ông tổ của học thuyết tế bào. Tuy nhiên, cả hai ông không phải là các tác giả đầu tiên phát biểu một nguyên tắc nào đó, mà chỉ là diễn đạt nguyên tắc ấy rõ ràng và hiển nhiên tới mức nó được phổ biến rộng rãi và cuối cùng đã được đa số các nhà sinh học thời ấy thừa nhận.

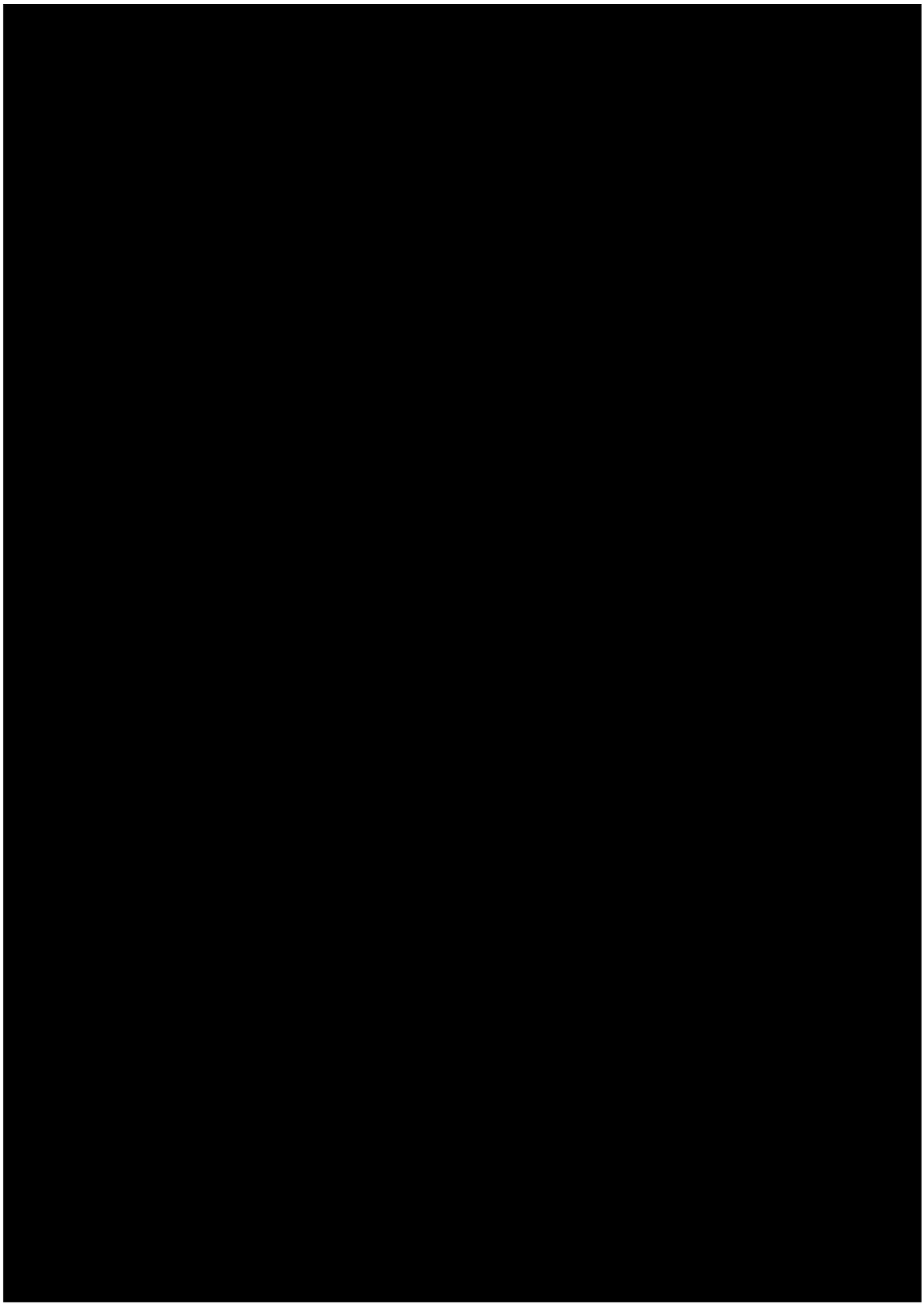
Năm 1902, Haberlandt là người đầu tiên đề xướng ra phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật để chứng minh cho tính toàn năng của tế bào. Theo ông mỗi một tế bào bất kỳ của một cơ thể sinh vật đa bào đều có khả năng tiềm tàng để phát triển thành một cá thể hoàn chỉnh. Như vậy mỗi tế bào riêng rẽ của một cơ thể đa bào đều chứa đầy đủ toàn bộ lượng thông tin di truyền cần thiết của cả sinh vật đó và nếu gặp điều kiện thích hợp thì mỗi tế bào có thể phát triển thành một cơ thể sinh vật hoàn chỉnh. Hơn 50 năm sau, các nhà thực nghiệm về nuôi cấy mô và tế bào thực vật mới đạt được thành tựu chứng minh cho khả năng tồn tại và phát triển độc lập của tế bào.

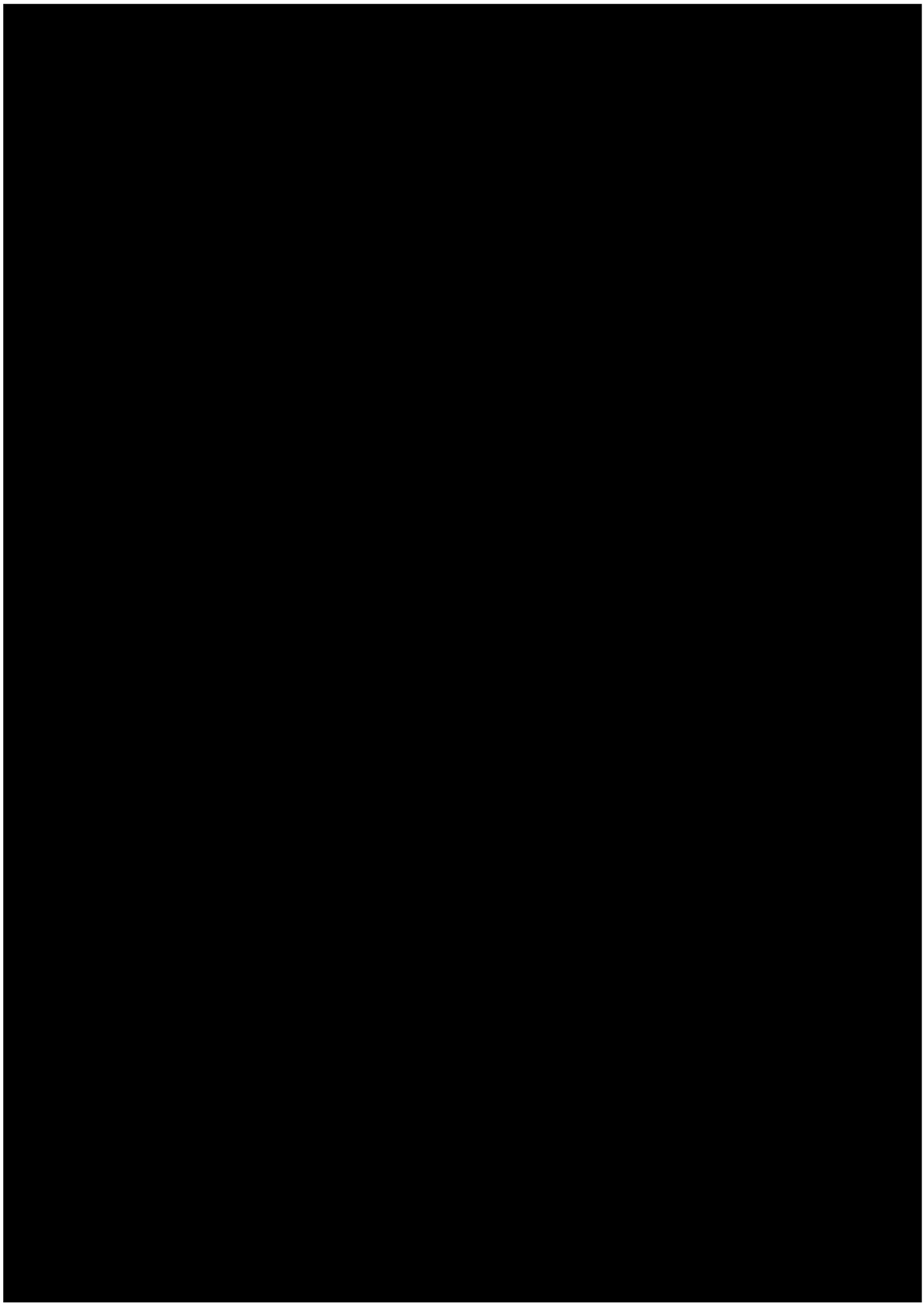
Tính toàn năng của tế bào thực vật đã được từng bước chứng minh. Nổi bật là các công trình: Miller và Skoog (1953) tạo được rễ từ mảnh mô cắt từ thân cây thuốc lá, Reinert và Steward (1958) đã tạo được phôi và cây cà rốt hoàn chỉnh từ tế bào đơn nuôi











trong thực tiễn sản xuất và đời sống. Một số ứng dụng chủ yếu của công nghệ nuôi cấy mô và tế bào thực vật:

- Nhân nhanh vô tính các giống cây quý:

Từ một mẫu nuôi cấy người ta có thể tạo ra hàng triệu cây con như nhau nếu đủ thời gian cấy chuyền. Tuy nhiên, hệ số cấy chuyền phụ thuộc nguồn giống. Chẳng hạn, các nhà khoa học đã kết luận từ một chồi dứa đưa vào nuôi cấy trong ống nghiệm có thể nhân ra hàng triệu cây dứa giống; từ một chồi chuối đưa vào nuôi cấy có thể nhân ra 2.000 cây chuối giống.

- Cải thiện giống cây trồng bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng:

Để phục tráng những giống cây quý đã nhiễm virus người ta có thể nuôi cấy đỉnh sinh trưởng để nhân nhanh. Qua một số lần nuôi cấy theo kiểu này sẽ tạo ra được những cây hoàn toàn sạch bệnh từ cây đã nhiễm virus.

- Tạo dòng đơn bội từ nuôi cấy bao phấn và nuôi cấy tế bào hạt phấn:

Người ta đã ứng dụng kĩ thuật nuôi cấy bao phấn và hạt phấn để tạo những cây đơn bội từ bao phấn hoặc hạt phấn, sau đó lưỡng bội hoá và tạo thành dòng đồng hợp tử.

- Khắc phục lai xa bằng cách thụ phấn trong ống nghiệm nhờ kĩ thuật nuôi cấy phôi:

Nhờ nuôi cấy trong ống nghiệm đã khắc phục tính bất hợp giao tử trước và sau khi thụ tinh đối với lai giữa các cây khác nhau khá xa về mặt di truyền.

- Lai vô tính còn gọi là dung nạp protoplast:

Nhờ kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật mà người ta đã tạo thành cây lai từ 2 giống khác nhau khá xa về mặt di truyền bằng cách dùng các enzyme để hoà tan màng tế bào rồi cho các protoplast vào nuôi cấy chung trong môi trường nhân tạo và chúng phát triển thành khối mô callus, từ đó chuyển khối callus này sang các môi trường phân hoá chức năng tế bào và để nuôi cấy thành cây lai.

- Tạo giống cây trồng mới bằng kỹ thuật chuyển gene:

Trên cơ sở xác định được tính trạng quý mà gene quy định, người ta có thể chuyển những gene đó vào những cây trồng khác với mong muốn tạo được những giống mới mang đặc tính mong muốn.

CÂU HỎI ÔN TẬP

Câu 1: Trình bày lịch sử phát triển của công nghệ nuôi cấy mô và tế bào thực vật ?

Câu 2: Trình bày cơ sở khoa học của công nghệ nuôi cấy mô và tế bào thực vật ?

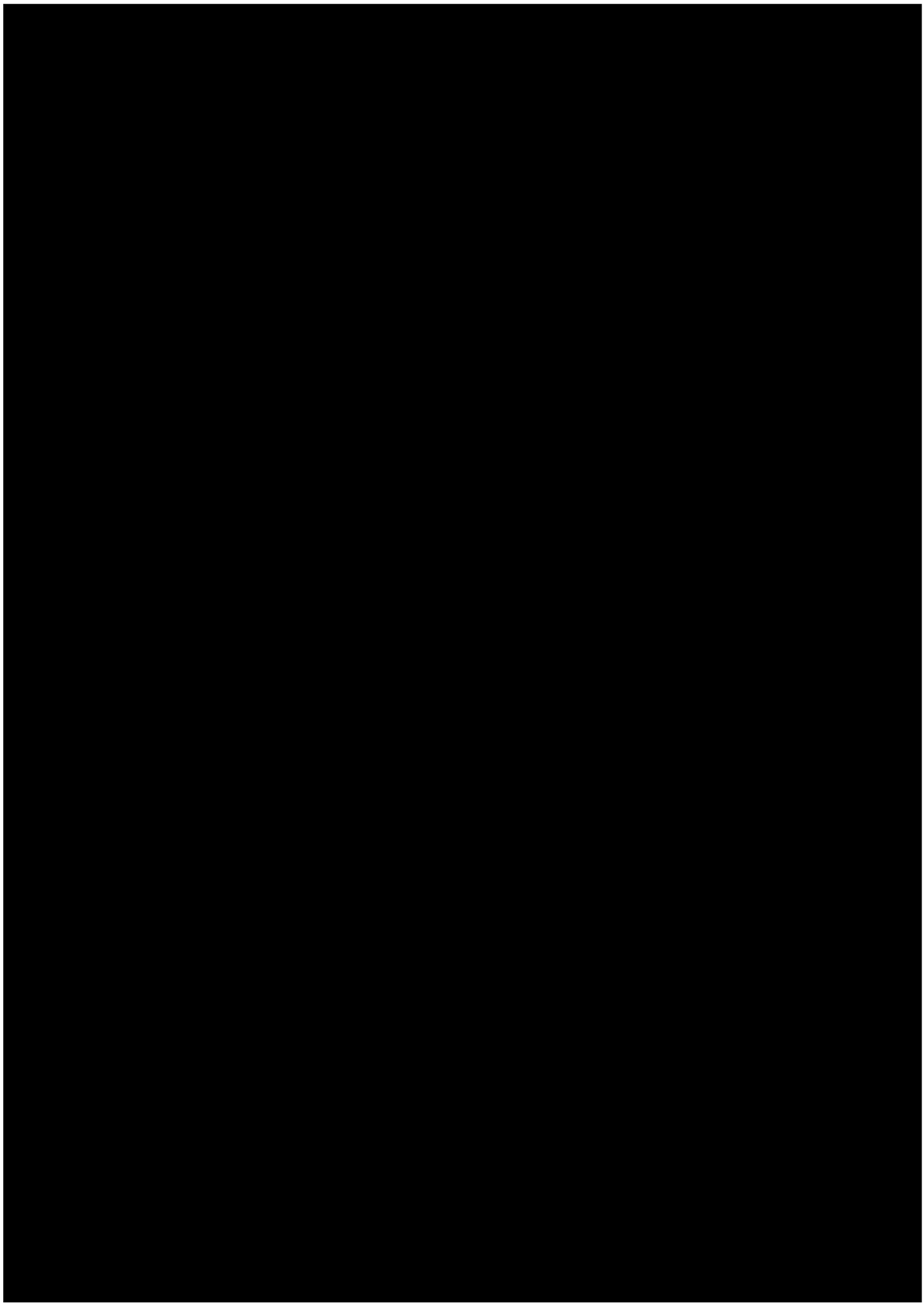
Câu 3: Trình bày các ứng dụng trong công nghệ nuôi cấy mô và tế bào thực vật ?

Câu 4: Hãy phân tích các ưu điểm và hạn chế của công nghệ nuôi cấy mô và tế bào thực vật đã triển khai trong thực tiễn sản xuất tại Việt Nam ?

Câu 5: Theo anh (chị), công nghệ nuôi cấy mô và tế bào thực vật ở nước ta nên tập trung phát triển phục vụ cho các lĩnh vự nào, vì sao ? Cho các ví dụ minh họa.

Câu 6: Phân biệt chồi bất định, đỉnh sinh trưởng ?

Câu 7: Thế nào là nuôi cấy đỉnh ngọn, nuôi cấy cơ quan, nuôi cấy đỉnh sinh trưởng ?



Công thức của môi trường dinh dưỡng cho các loại mô và thực vật nào đó đóng vai trò quan trọng để thiết lập những điều kiện thích hợp cho nuôi cấy. Những thành phần chính của môi trường dinh dưỡng nuôi cấy mô bao gồm các khoáng đa lượng, vi lượng, nguồn nitrogene (bao gồm các amino acid), nguồn carbon, các chất hữu cơ bổ sung (các vitamin chủ yếu và các chất bổ sung khác), các chất điều hoà sinh trưởng. Các thành phần trong môi trường cơ bản phải được phối hợp ở nồng độ cố định. Chất điều hoà sinh trưởng được cung cấp cho sự phát sinh cơ quan và cân bằng với các chất tương ứng nội sinh trong các loại mô nuôi cấy. Các chất bổ sung được phối trộn vào môi trường nuôi cấy để đạt được các mục đích nuôi cấy như: than hoạt tính, chất chống oxi hóa, chất ức chế ethylene, các phụ gia hữu cơ; các tác nhân kháng sinh, kháng nấm cũng được bổ sung để ngăn ngừa các tác nhân nhiễm bẩn mẫu vật.

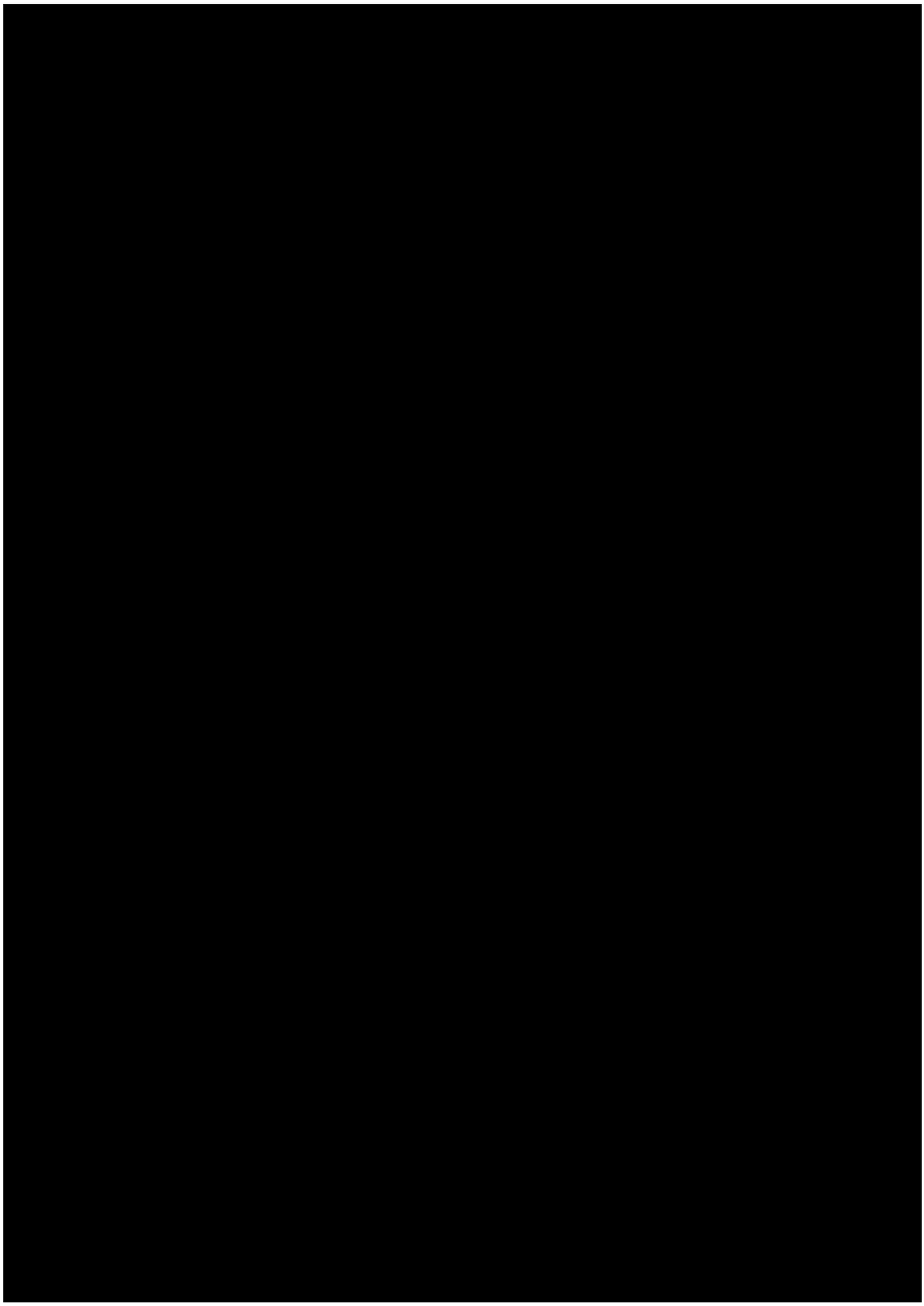
Trước đây, những hiểu biết về nhu cầu dinh dưỡng của tế bào thực vật còn hạn chế và đặc biệt là vai trò của chất điều hoà sinh trưởng đối với quá trình phân chia và phân hóa của tế bào còn chưa được biết nhiều. Hiện nay, hầu hết các môi trường dinh dưỡng nhân tạo được sử dụng để nuôi cấy mô và tế bào thực vật.

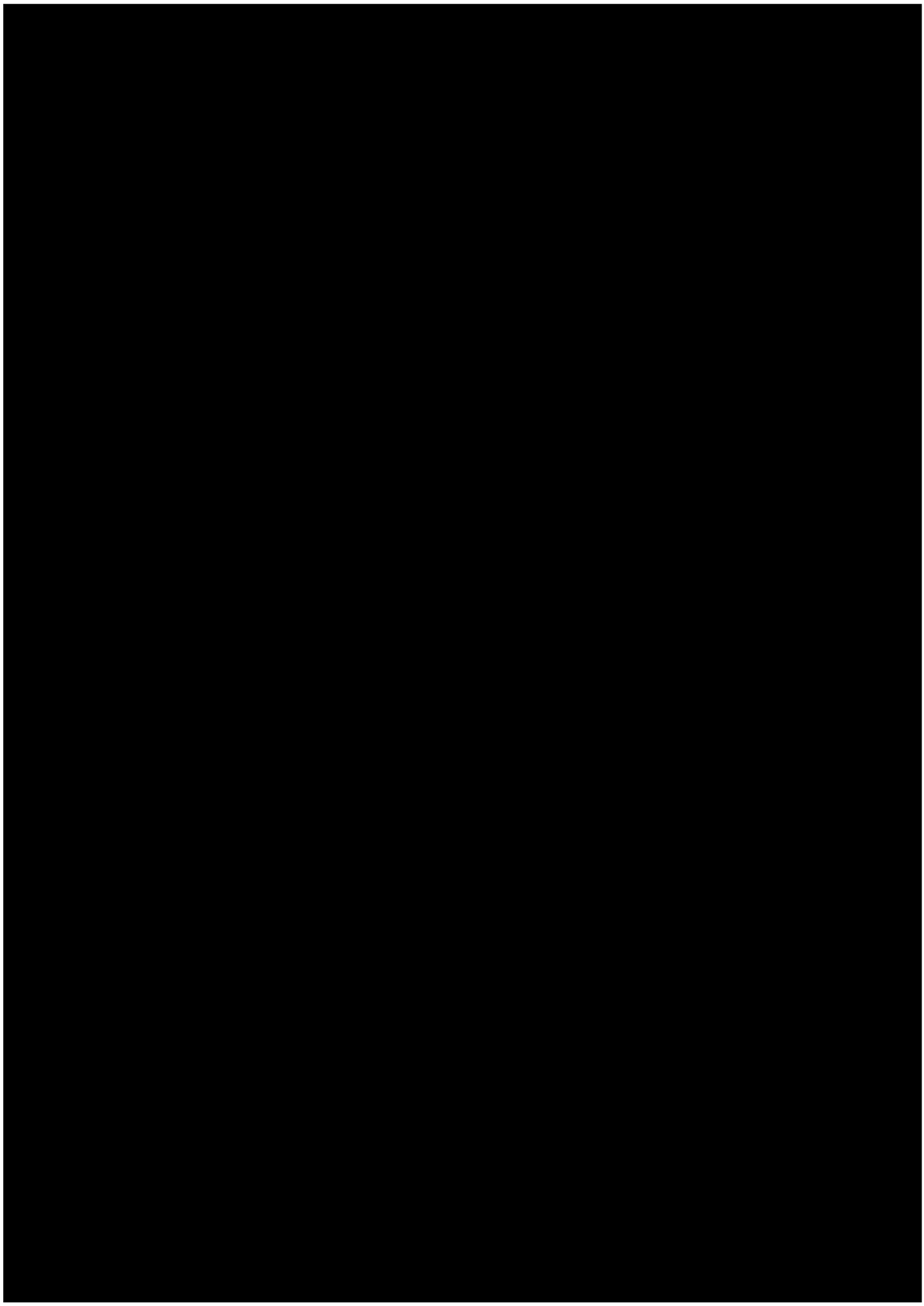
3.1.1. Dinh dưỡng vô cơ

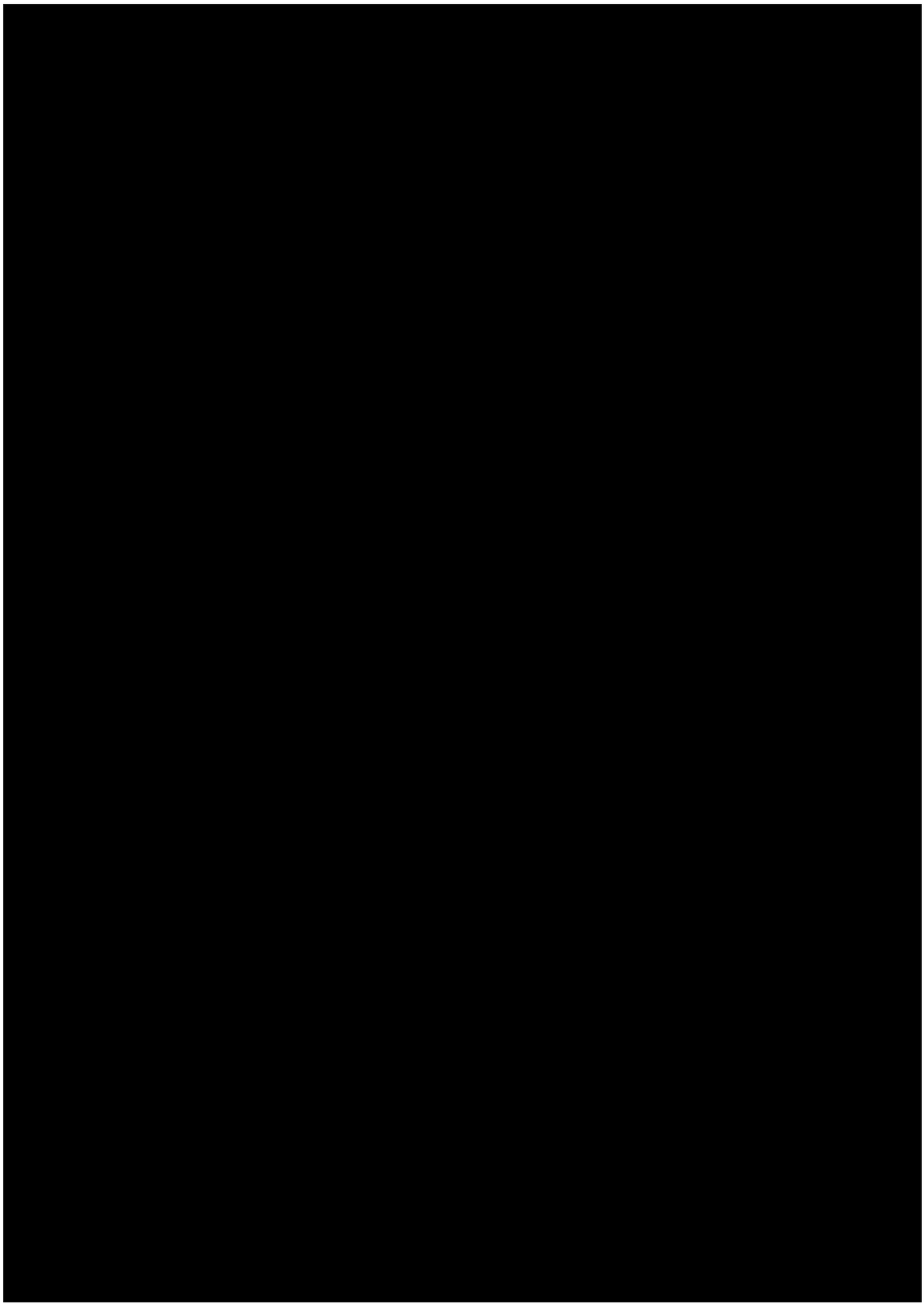
Có nhiều loại nguyên tố muối khoáng khác nhau cần thiết cho đời sống thực vật được cung cấp dưới dạng đa lượng và vi lượng. Các nguyên tố đa lượng là các nguyên tố được sử dụng ở nồng độ lớn hơn 0,5 mM, còn các nguyên tố vi lượng là các nguyên tố được sử dụng ở nồng độ nhỏ hơn 0,05 mM. Khi các muối khoáng được hòa tan trong nước, chúng trải qua quá trình phân ly và ion hóa. Trong môi trường dinh dưỡng, một loại ion có thể được kết hợp bởi một hoặc nhiều loại muối khác nhau. Do đó, đây là điều quan trọng để so sánh các môi trường khác nhau bằng cách đánh giá nồng độ tổng số của các ion hiện diện trong chúng nhằm có được một ý tưởng về sự thích hợp của môi trường cho các mô hoặc các hệ thống nuôi cấy đặc biệt.

3.1.1.1. Các nguyên tố khoáng đa lượng

Các chất dinh dưỡng đa lượng bao gồm sáu nguyên tố: nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) và sulphur (S) tồn tại dưới dạng muối khoáng (**Bảng 3.1**). Tất cả các nguyên tố này là rất cần thiết cho sinh trưởng của mô và tế bào thực vật. Môi trường nuôi cấy phải chứa ít nhất 25 mM nitrate và







Các mô và tế bào thực vật trong môi trường nuôi cấy ít có khả năng tự dưỡng và vì thế cần thiết phải bổ sung nguồn carbon bên ngoài để cung cấp năng lượng. Thậm chí các mô bắt đầu lục hóa hoặc hình thành diệp lục tố dưới các điều kiện đặc biệt trong suốt quá trình nuôi cấy đã không tự dưỡng carbon. Việc bổ sung nguồn carbon bên ngoài vào môi trường làm tăng phân chia tế bào và tái sinh các chồi.

3.1.2.2. Các vitamin và amino acid

Thực vật tự tổng hợp các vitamin và chúng được sử dụng như những chất xúc tác trong các quá trình trao đổi chất khác nhau. Các vitamin ở thực vật hoạt động như các coenzyme, giúp cho mô nuôi cấy sinh trưởng tốt. Khi các tế bào và mô thực vật sinh trưởng trong điều kiện *in vitro*, một số vitamin không thể thay thế được tổng hợp nhưng thường không đủ về lượng, do đó phải bổ sung thêm từ bên ngoài vào. Các vitamin thuộc nhóm B được sử dụng rộng rãi nhất trong nuôi cấy (**Bảng 3.3**).

a.Vitamin B_1

Là một chất bổ sung rất cần cho môi trường nuôi cấy. Khi khử trùng bằng cách hấp ở nhiệt độ cao vit B1 bị nhiệt phân thành pyrimidin và thiazol là hai cấu tử của vit B1, nhưng tế bào nuôi cấy có khả năng tổng hợp lại chúng thành phân tử vit B1. Vì vậy không nhất thiết phải khử trùng bằng phương thức khác như lọc chẳng hạn.

b. Vitamin B_2

Có thể khử trùng bằng nhiệt, nhưng lại dễ bị ánh sáng phân huỷ. Đối với nuôi cấy sáng chỉ dùng nồng độ 0,01 ppm, nhưng đối với nuôi cấy trong tối có thể tăng lên 10 - 50 ppm.

Bảng 3.3. Các loại vitamin thường dùng trong nuôi cấy mô

TT	Tên vitamin	Nồng độ (mg/L)
1	Myo - inositol	100
2	Nicotinic acid	0,5 - 1
3	Pyridoxine.HCl (B_6)	0,05 - 0,5
4	Thiamine.HCl (B_1)	10 - 50
5	Panthotenate calcium (B_5)	1 - 5
6	Riboflavin (B_2)	1 - 5

7	Biotin	0,1 - 1
8	Folic acid	0,1 - 1

c. Vitamin B_6

Là tiền chất của pyridoxal-phosphate-cofactor của các nhóm enzyme như carboxylase và transaminase. Khi khử trùng ở nhiệt độ cao phản ứng xảy ra như sau:

Pyridoxin + phosphat → pyridoxalphosphate

d. Myo - inositol

Có vai trò trong sinh tổng hợp thành tế bào, cụ thể là sinh tổng hợp acid polygalacturonic và pectine. Inosit là chất bền vững khi khử trùng. Thường được sử dụng ở nồng độ cao 100 ppm. Khi phân tích thành phần của nước dừa người ta thu được inosit trong một phân đoạn trung tính.

e. Biotin

Cần thiết cho sự phân bào của một số loại mô. Chỉ sử dụng ở nồng độ rất thấp từ 0,001 - 0,01 ppm.

f. Acid pantothenic (bios III, vit B_5)

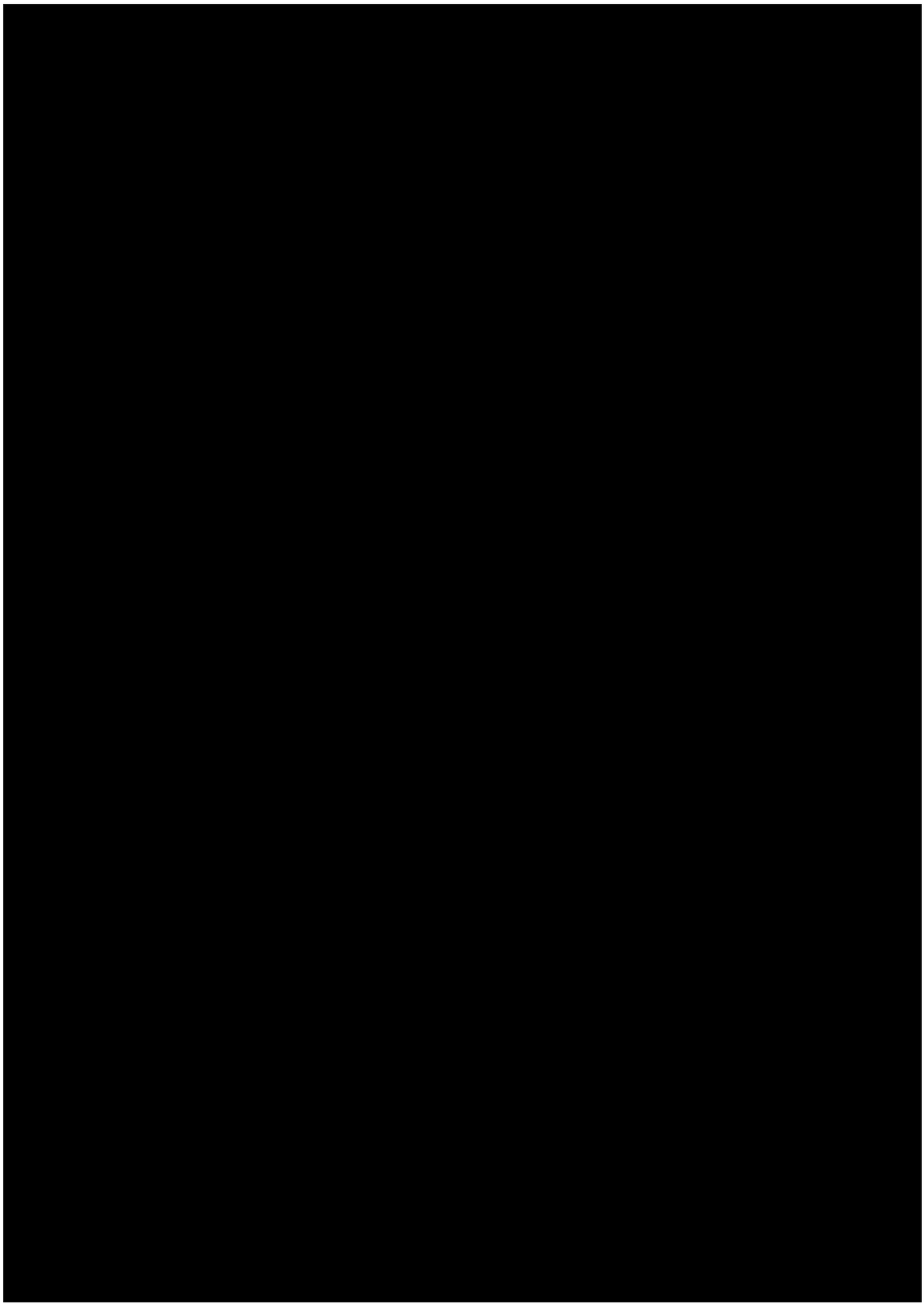
Được sử dụng để làm thành phần của coenzyme A .

g. Nicotinic acid và pyridoxine

Thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhưng có thể thay thế bằng các vitamin khác cho sự sinh trưởng của tế bào ở nhiều loài. Các vitamin khác như folic acid, ascorbic acid, vitamin E (tocophenol), và ρ-aminobenzoic acid cũng được sử dụng trong nuôi cấy mô và tế bào, đặc biệt khi tế bào sinh trưởng ở mật độ quần thể rất thấp. Nói chung, các vitamin này được bổ sung trong khoảng 0,1 - 10,0 ppm.

Bảng 3.4. Vai trò của một số thành phần dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy

Thành phần	Dạng tồn tại	Vai trò
Potassium	K^+	Cần thiết cho phân chia tế bào, tổng hợp protein và diệp lục
Magnesium	Mg^{2+}	Thành phần cấu tạo nên phân tử diệp lục



L-asparagine (100 mM), L-glycine (2 mM), L-arginine và L-cystein (10 mM) là nguồn N hữu cơ thích hợp được dùng trong các môi trường nuôi cấy. Tyrosine (100 mM) chỉ được dùng khi có bổ sung agar vào môi trường. Các amino acid được bổ sung riêng lẻ thường hạn chế sự sinh trưởng của tế bào trong khi hỗn hợp của chúng lại có hiệu quả hơn. Bổ sung vào môi trường adenine sulphate có thể kích thích sinh trưởng của tế bào hoặc làm tăng khả năng tạo chồi.

3.1.2.3. Các hữu cơ bổ sung

Trước đây, các nhà khoa học sáng lập ra các kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật thường sử dụng môi trường dinh dưỡng rất đơn giản gồm muối khoáng và đường. Ngày nay, người ta khẳng định rằng loại môi trường đơn giản như vậy không đủ để cho tế bào sinh trưởng bình thường. Vì vậy, thành phần môi trường ngày càng phong phú và phức tạp hơn, một số hỗn hợp dinh dưỡng tự nhiên đã được sử dụng như:

a. Nước dừa

Từ năm 1941, nước dừa đã được sử dụng để nuôi phôi *Datura* và sau đó năm 1949, nuôi mô *Daucus*. Phân tích thành phần của nước dừa từ non đến già cho thấy trong nước dừa có:

- Amino acid tự do từ 190,5 - 685,0 ppm trong nước dừa từ non đến già. Khi khử trùng ở nhiệt độ cao còn lại khoảng 70 ppm;

- Amino acid trong protein;

- Acid hữu cơ;

- Đường;

- RNA và DNA .

Ngoài ra, nước dừa còn chứa các hợp chất quan trọng đối với tế bào nuôi phân lập như: myo-inositol, các hợp chất có hoạt tính auxin, các cytokinin dạng glycoside.

b. Dịch chiết mộng lúa mỳ

Thành phần hóa học chưa được phân tích rõ ràng

c. Dịch chiết nấm men

Vào năm 1934, White lần đầu tiên nuôi thành công rễ cà chua trong ống nghiệm kéo dài vô thời hạn với dịch chiết nấm men. Sau đó thành phần hóa học của dịch nấm

men ít được chú ý phân tích. Chủ yếu chứa: đường, nucleic acid, amino acid, vitamin, auxin, muối khoáng. Tác dụng của dịch chiết nấm men với rễ rất tốt nhưng với callus thì không rõ ràng.

d. Dịch thủy phân casein

Được sử dụng rộng rãi trong kỹ thuật vi sinh vật, ở nuôi cấy mô và tế bào thực vật chủ yếu được sử dụng làm nguồn bổ sung amino acid.

e. Hỗn hợp amino acid nhân tạo

Dựa vào những kết quả phân tích các hỗn hợp chất tự nhiên nói trên nhiều tác giả đã đề ra những công thức pha chế hỗn hợp amino acid nhân tạo để bổ sung vào môi trường dinh dưỡng. Kết quả sử dụng các hỗn hợp này còn rất khác nhau, có thể do yêu cầu amino acid của từng loại tế bào là không giống nhau. Trong môi trường lỏng để nuôi callus lúa và môi trường tái sinh cây lúa từ callus thì proline là một thành phần quan trọng.

f. Các kháng sinh

Bổ sung các kháng sinh vào môi trường nuôi cấy nói chung thường được tránh do sự hiện diện của chúng trong môi trường làm chậm sinh trưởng của mô và tế bào. Tuy nhiên, một số tế bào thực vật bị nhiễm một cách hệ thống các vi sinh vật. Để ngăn chặn sinh trưởng của bọn vi sinh vật này, điều không thể thay thế là làm giàu môi trường bằng kháng sinh. Streptomycin hoặc kanamycin ở nồng độ thấp kiểm soát hiệu quả hiện tượng nhiễm có tính hệ thống và môi trường được bổ sung các kháng sinh này không gây bất lợi cho sự sinh trưởng của tế bào nuôi cấy.

g. Than hoạt tính

Bổ sung than hoạt tính (AC) vào môi trường nuôi cấy đã kích thích sinh trưởng và phân hóa ở các loài hoa lan, cà rốt, dây thường xuân và cà chua. Ngược lại, nó gây ức chế ở thuốc lá, đậu tương và các loài thuộc chi *Camellia*. Nói chung AC được rửa acid và trung hòa trước khi bổ sung nó ở nồng độ 0,5-3% vào môi trường nuôi cấy. AC cũng giúp làm giảm độc tố bằng cách đào thải các hợp chất độc (ví dụ: phenol) được tạo ra trong quá trình nuôi cấy và cho phép tế bào sinh trưởng mà không bị trở ngại gì.

3.1.3. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Mặc dù trong mẫu vật thực nuôi cấy có chứa một mức độ nhất định các điều hoà sinh trưởng nội sinh, nhưng thường vẫn cần phải bổ sung các chất ngoại sinh để cảm

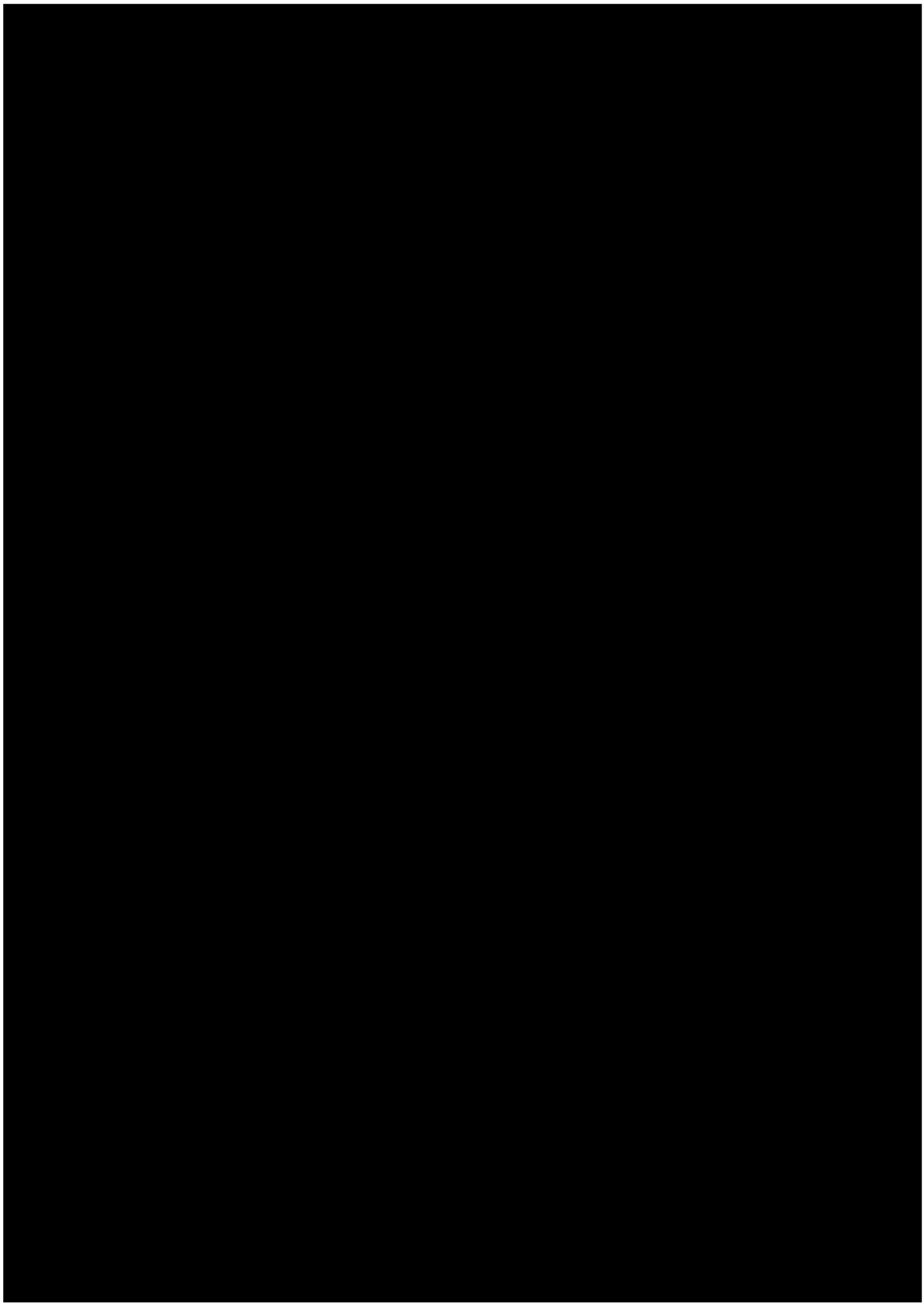
ứng những phản ứng nhất định nào đó của mẫu nuôi cấy. Chất điều hoà được yêu cầu một hàm lượng rất nhỏ, với đơn vị thường dùng mg/L. Hàm lượng của chúng trong môi trường thay đổi phụ thuộc vào giống thực vật, đặc điểm tự nhiên của mô mô cũng như giai đoạn nuôi cấy (cảm ứng tạo callus, hình thành phôi soma, biệt hóa phát sinh chồi/nhân nhanh chồi, tạo rễ từ chồi…). Tỷ lệ của các loại chất điều hoà sinh trưởng cần cho sự tạo rễ và chồi rất khác nhau, và mô là nơi dường như liên quan trực tiếp với lượng chất điều hoà sinh trưởng được tổng hợp nội sinh ở các tế bào của mẫu vật nuôi cấy.

Để phát triển một quy trình nuôi cấy mô cho một loài thực vật mới, các loại và nồng độ các chất điều hoà trong nhiều tổ hợp cần được khảo sát. Có bốn nhóm chất chất điều hoà đó là auxin, cytokinin, gibberellin và abscisic acid, những chất này có vai trò quan trọng trong nuôi cấy mô. Sự sinh trưởng, phân hóa và phát sinh cơ quan của mô nuôi cấy trở nên thuận lợi chỉ khi bổ sung một hoặc một số chất thuộc bốn nhóm trên vào môi trường nuôi cấy.

3.1.3.1. Các auxin

Auxin có liên quan đến nhiều quá trình sinh trưởng, phát triển ở thực vật, Mặc dù, những chi tiết ở mức độ phân tử về hoạt động của auxin vẫn chưa được biết nhiều, nhưng một số nghiên cứu về di truyền và phân tử đã cung cấp những kết quả mới thú vị. Trong những năm qua, một số gen mã hóa cho các protein liên kết auxin đã được tạo dòng và khảo sát các đặc điểm của chúng, và thông tin mới về gen cảm ứng auxin cũng đã thu được. Auxin có tác dụng hoạt hóa các ion H^+ trực tiếp hoặc gián tiếp (thông qua sự ảnh hưởng lên các enzyme) làm tăng tính đàn hồi của thành tế bào, tăng tính giản nỡ của tế bào trong phản ứng với áp suất trương. Auxin cũng có ảnh hưởng ở mức độ biểu hiện gen và kích thích quá trình tạo rễ.

Đặc điểm chung của các auxin là tính chất phân chia tế bào. Các chất điều hoà sinh trưởng thuộc nhóm này có các hoạt tính như: tăng trưởng chiều dài thân, lóng; tính hướng sáng, đất; tính ưu thế ngọn, tạo rễ, và phân hóa mạch dẫn. Trong nuôi cấy mô, auxin đã được sử dụng để kích thích sự phân chia, biệt hóa của tế bào; phát sinh cơ quan và phôi. Nhìn chung, auxin ở nồng độ thấp thì thích hợp cho tạo rễ *in vitro*, trong khi đó ở nồng độ cao hơn thì cảm ứng tạo callus. Hiện nay các loại auxin được dùng phổ biến trong nuôi cấy mô như: 1H- indole-3-acetic acid (IAA), 1-naphthaleneacetic acid



- Tương tự các cytokinin khác, zeatin cũng là một dẫn xuất của adenin. Trong thực tiễn nuôi cấy mô người ta chỉ dùng zeatin trong những trường hợp đặc biệt vì giá thành rất đắt, thường thay thế zeatin bằng kinetin hoặc một sản phẩm tổng hợp nhân tạo khác, đó là:

Tỷ lệ auxin/cytokinin rất quan trọng đối với sự phát sinh hình thái trong các hệ thống nuôi cấy. Đối với sự phát sinh phôi, để tạo callus và rễ cần có tỷ lệ auxin/cytokinin cao, trong khi ở trường hợp ngược lại sẽ dẫn đến sự sinh sản chồi và chồi nách. Vấn đề quan trọng không kém là nồng độ của hai nhóm chất điều khiển sinh trưởng này. Chẳng hạn 2,4-D cùng với BA ở nồng độ 5,0 ppm kích thích sự tạo thành callus ở *Agrostis* nhưng nếu dùng ở nồng độ 0,1 ppm chúng sẽ kích thích tạo chồi mặc dù trong cả 2 trường hợp tỷ lệ auxin/cytokinin là bằng 1. Cơ chế hoạt động của cytokinin là chưa được biết rõ ràng mặc dù có một số kết quả về sự có mặt của các hợp chất mang hoạt tính cytokinin trong RNA vận chuyển (transfer RNA). Các cytokinin cũng có hoạt tính tổng hợp RNA, tăng hoạt tính enzyme và protein trong các mô nhất định.

3.1.3.3. Gibberellin

Gibberellin được phát hiện vào những năm 1930. Lịch sử phát hiện nhóm protoplast này bắt đầu từ 1895 khi người Nhật nói về bệnh lúa von. Năm 1926, xác định được bệnh đó là do loài nấm *Gibberella fujikuroi* gây ra. Đến những năm 30, mới phân lập và tinh chế được hoạt chất, được gọi là gibberellin. Mãi sau chiến tranh thế giới thứ II năm 1950, người Anh và người Mỹ mới biết đến công trình này của người Nhật. Tới nay, người ta đã phát hiện được trên 60 loại thuộc nhóm gibberellic acid. Loại gibberellic acid thông dụng nhất trong nuôi cấy mô thực vật là GA_3.

Trong đời sống thực vật gibberellin đóng vai trò quan trọng đối với nhiều quá trình sinh lý như: sinh lý ngủ nghỉ của hạt và chồi, sinh lý phát triển của hoa, làm tăng sinh trưởng chiều dài của thực vật. Trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật, tác dụng của gibberellic acid chưa thật rõ ràng. Nhiều tác giả có sử dụng và coi đó là thành phần không thể thiếu của một loại môi trường chuyên dụng nào đó.

3.1.3.4. Abscisic acid (ABA)

Abscisic acid (ABA) thuộc nhóm các chất ức chế sinh trưởng tự nhiên gây ra sự ngủ nghỉ của chồi, làm chậm sự nảy mầm của hạt và sự ra hoa, đóng khí khổng. ABA

còn có tác dụng tăng cường khả năng chống chịu của tế bào thực vật đối với điều kiện ngoại cảnh bất lợi, vì vậy ABA được đưa vào môi trường nuôi cấy và mang lại hiệu quả nhất định.

3.1.4. Tác nhân làm rắn môi trường

Các tác nhân làm rắn hoặc tạo gel được sử dụng phổ biến để chuẩn bị các môi trường nuôi cấy mô dạng rắn hoặc dạng sệt. Trong nuôi cấy dịch lỏng mô hoặc tế bào bị ngập trong môi trường và chết do thiếu oxy. Các gel tạo một giá đỡ cho mô sinh trưởng trong điều kiện tĩnh.

Agar là một loại polysaccharide thu được từ một số loài tảo, chúng có ưu điểm hơn các tác nhân tạo gel khác. Trước tiên, gel của agar không phản ứng với các thành phần của môi trường. Thứ hai, chúng không bị thủy phân bởi các enzyme thực vật và duy trì sự ổn định ở tất cả các nhiệt độ nuôi cấy được tiến hành. Bình thường, từ 0,5-1% agar được dùng trong môi trường để tạo gel rắn chắc ở pH đặc trưng cho môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Trong những nghiên cứu về dinh dưỡng, việc sử dụng agar được tránh bởi vì agar thương phẩm không sạch do có chứa một số ion Ca, Mg, K, Na và một số nguyên tố khác ở dạng vết. Tuy nhiên, các chất bẩn nói trên cũng có thể được loại bỏ bằng cách rửa agar với nước cất hai lần ít nhất là 24 giờ, tráng trong cồn và làm khô ở 60°C trong 24 giờ. Nói chung, ở 80°C agar ngậm nước chuyển sang trạng thái sol và ở 40°C trở về trạng thái gel. Khả năng ngậm nước của agar cao từ 6-12 g/L nước.

Gelatin ở nồng độ cao (10%) cũng có hiệu quả tạo gel nhưng bị hạn chế sử dụng bởi vì nó nóng chảy ở nhiệt độ thấp (25°C). Các hợp chất khác đã được thử nghiệm thành công bao gồm methacel, alginate, phytagel và gelrite. Công ty FMC Corp. gần đây đã phát triển một loại agarose được tinh sạch cao gọi là Sea Plaque(*k*), loại này có thể được dùng để phục hồi các protoplast đơn trong nuôi cấy. Cellophane đục lỗ, cầu giấy lọc, bấc giấy lọc, bọt polyurethane và xốp polyester là các phương thức thay đổi giá thể được dùng trong môi trường nuôi cấy mô hoặc tế bào.

Điều thuận lợi khi làm việc với các hợp chất tạo gel nhân tạo là chúng tạo ra các gel sạch ở các nồng độ tương đối thấp (1,25 - 2,5 g/L) và nó có thể giúp phát hiện sự nhiễm bẩn được phát triển trong suốt thời gian nuôi cấy. Các mẫu vật sinh trưởng tốt

hơn trên agar hoặc các tác nhân tạo giá thể khác phụ thuộc vào loại mô và từng loài khác nhau.

3.1.5. pH môi trường

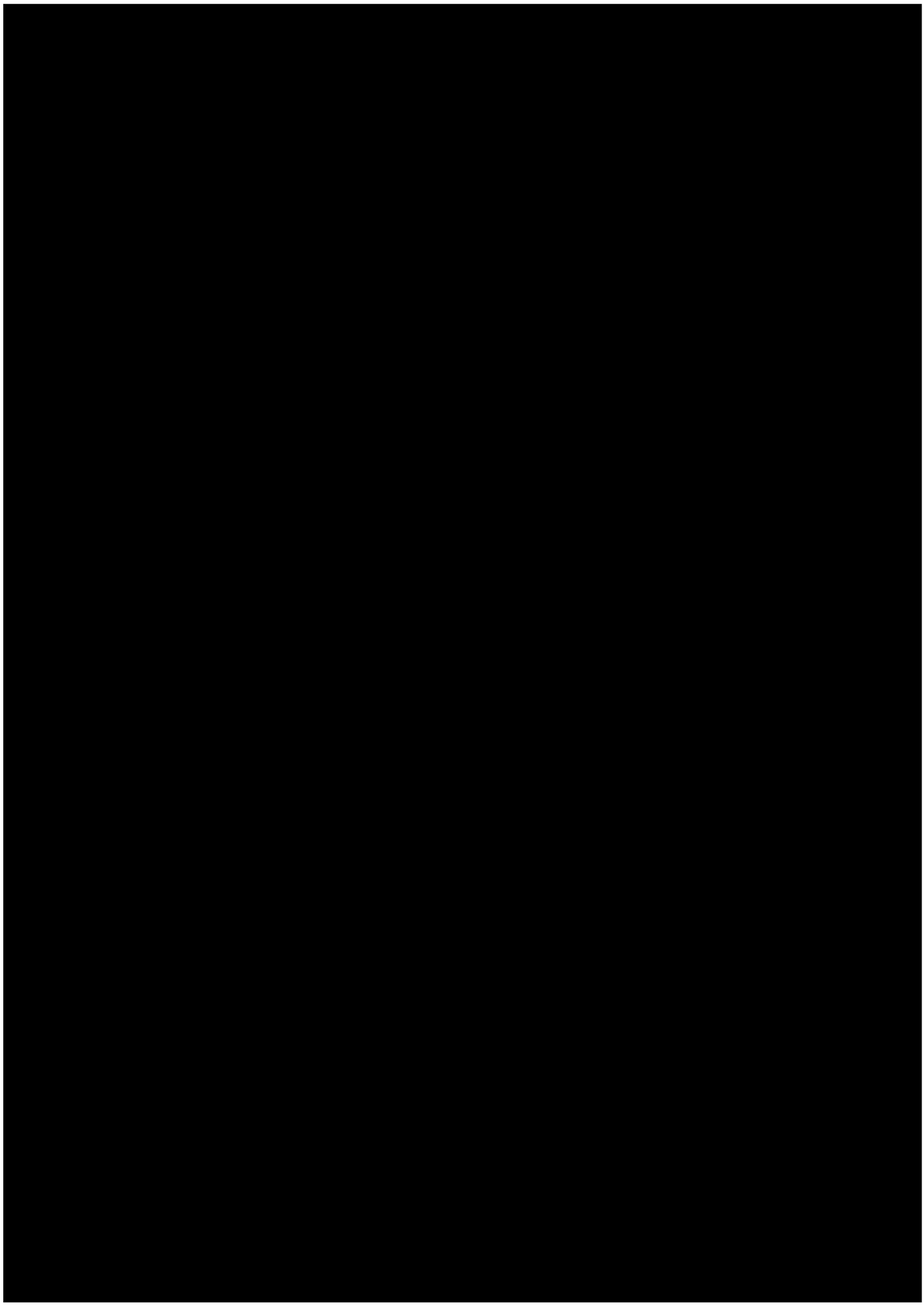
Tế bào và mô thực vật đòi hỏi pH tối ưu cho sinh trưởng và phát triển trong nuôi cấy. Trong khi chuẩn bị môi trường, pH có thể được điều chỉnh đến giá trị cần thiết của thí nghiệm. Độ pH ảnh hưởng đến sự di chuyển của các ion và đối với hầu hết các môi trường nuôi cấy pH 5,0-6,0 trước khi khử trùng được xem là tối ưu. Độ pH cao hơn sẽ làm cho môi trường rất rắn trong khi pH thấp lại giảm khả năng đông đặc của agar. Hầu hết các môi trường nuôi cấy nghèo đệm, vì thế chúng làm dao động giá trị pH, sự giao động này có thể gây bất lợi cho thí nghiệm nuôi cấy dài ngày và sự sinh trưởng của các tế bào đơn hoặc các quần thể tế bào ở mật độ thấp.

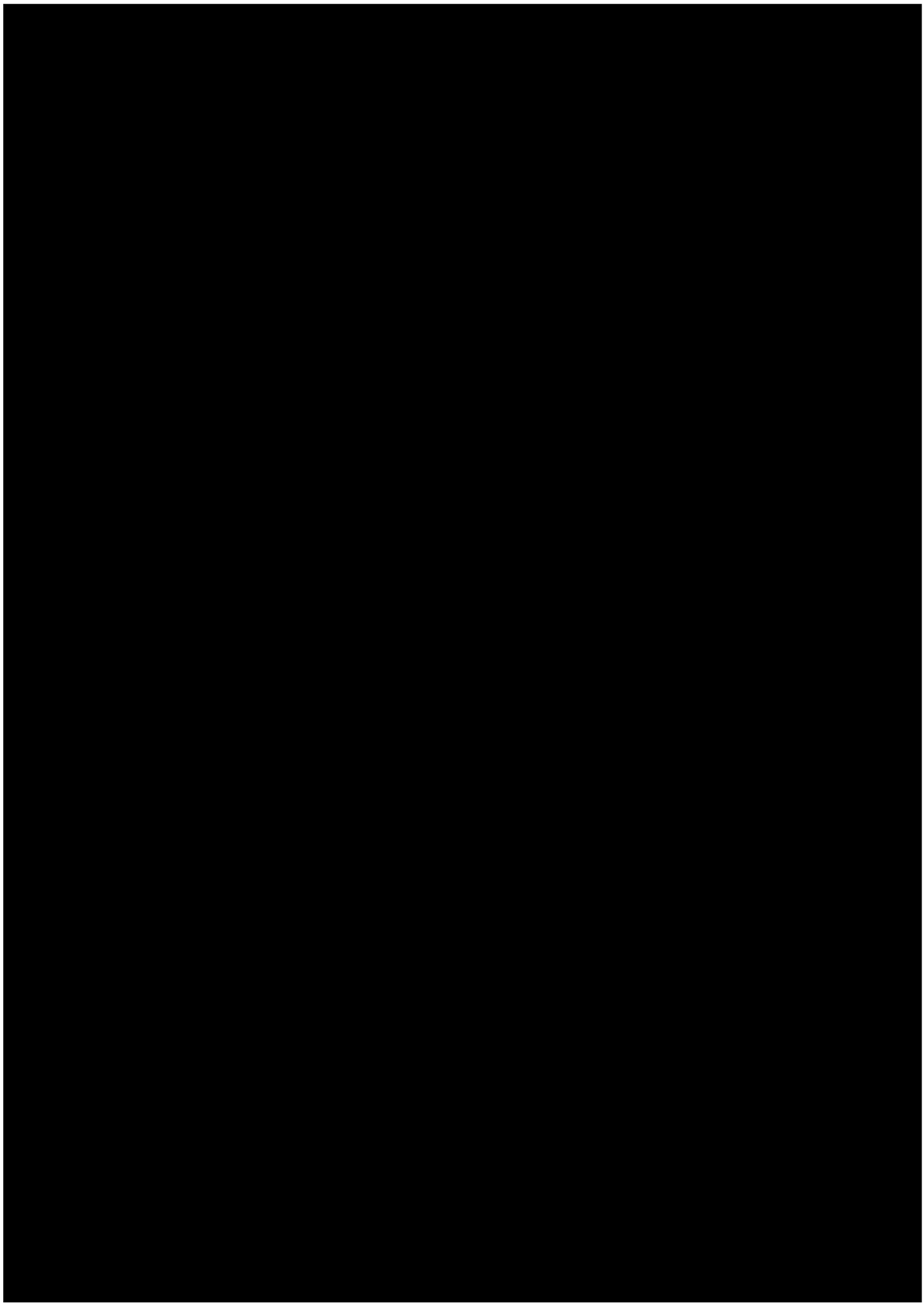
Độ pH của môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình thu nhận các chất dinh dưỡng từ môi trường vào tế bào. Vì vậy, đối với từng môi trường nhất định và từng trường hợp cụ thể của các loài cây phải chỉnh độ pH của môi trường về mức ổn định ban đầu. Nuôi cấy callus của nhiều loài cây, pH ban đầu thường là 5,5 - 6,0 sau 4 tuần nuôi cấy pH đạt được giá trị từ 6,0 - 6,5. Đặc biệt khi sử dụng các loại phụ gia có tính kiềm hoặc tính acid cao như amino acid, vitamin thì nhất định phải phải dùng NaOH hoặc HCl loãng để chỉnh pH môi trường về từ 5,5 - 6,5. Những thí nghiệm nuôi cấy tế bào đơn hay tế bào trần thì việc chỉnh độ pH là bắt buộc.

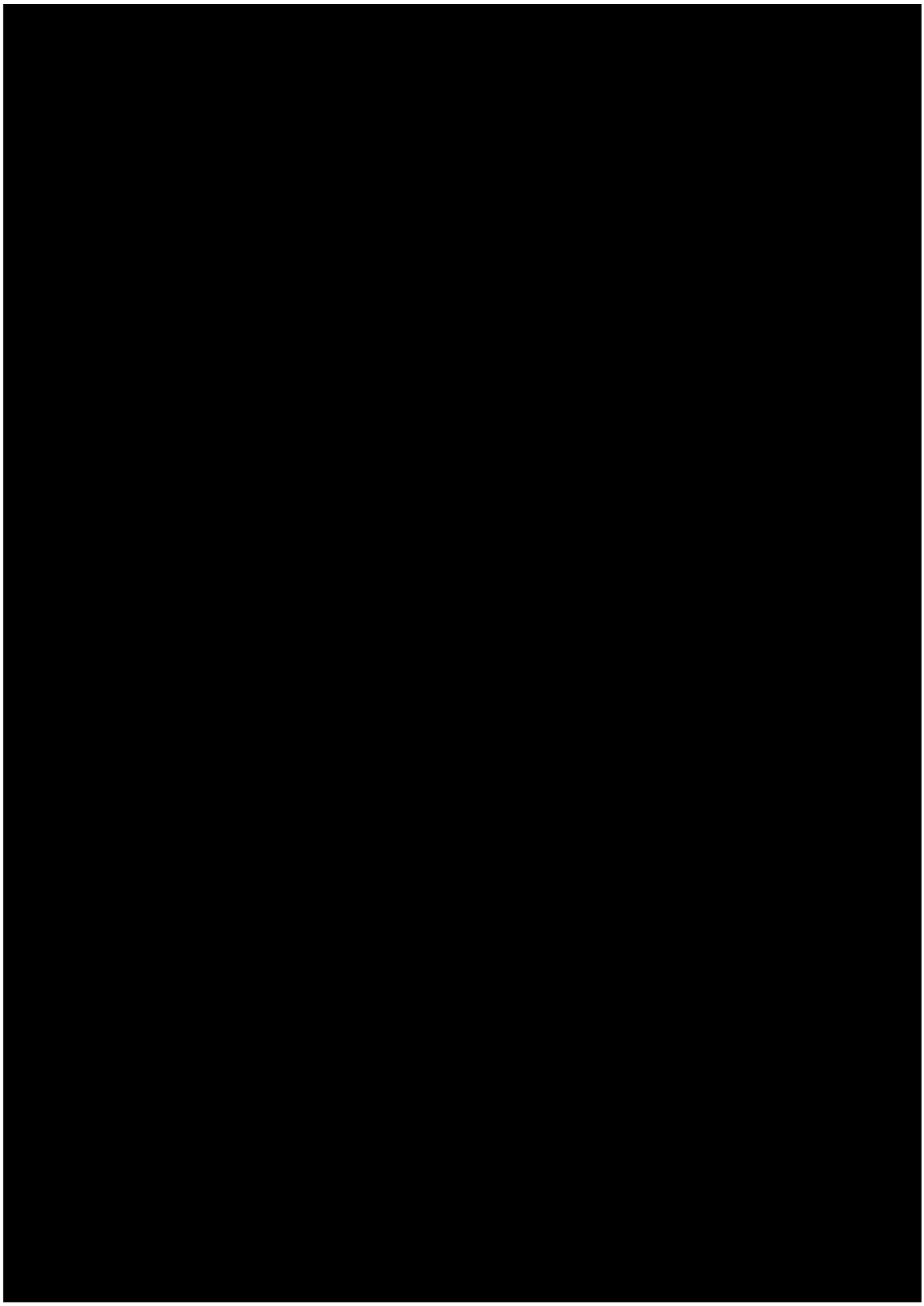
3.1.6. Một số loại môi trường cơ bản dùng trong nuôi cấy

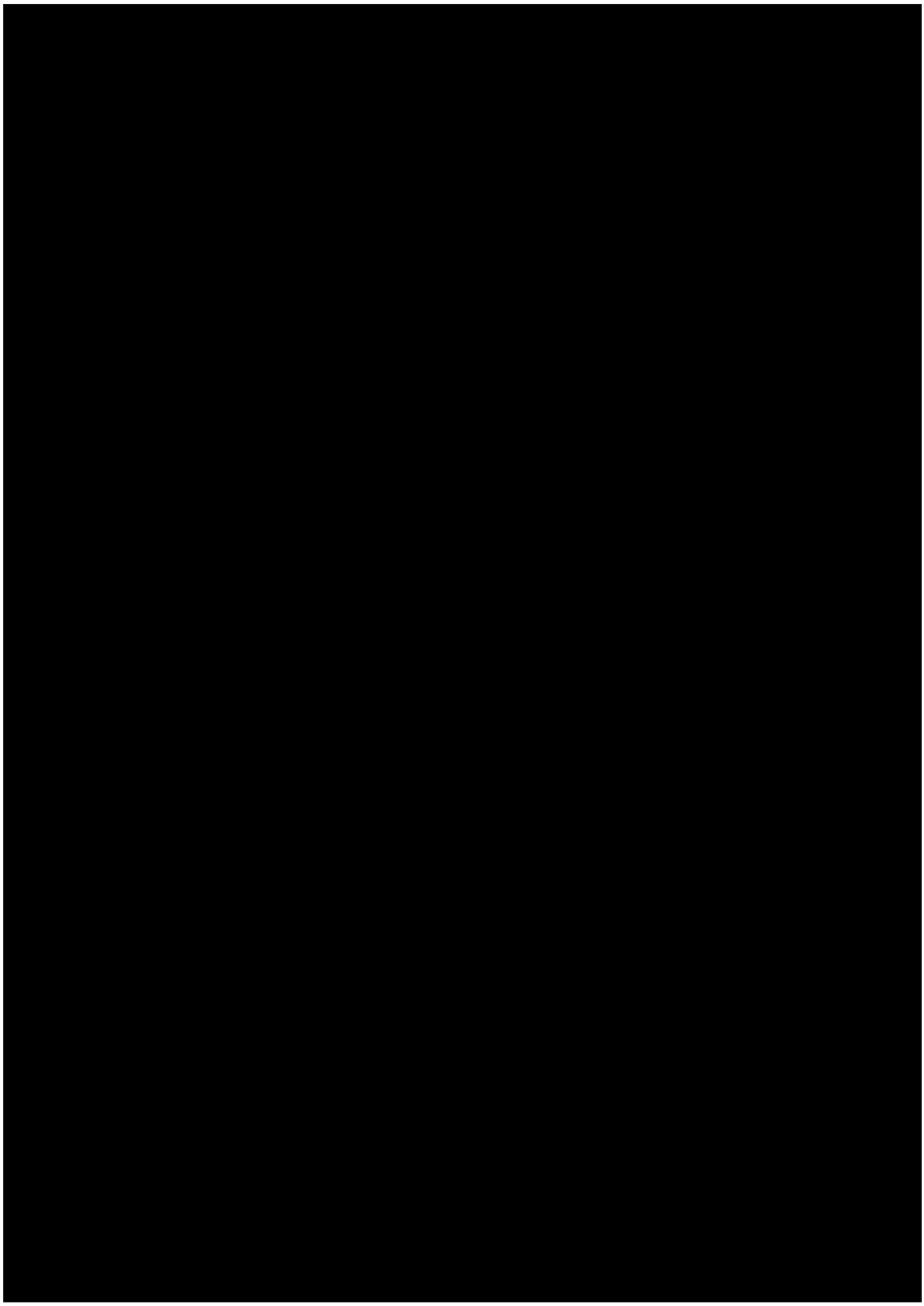
Bảng 3.5. Thành phần dinh dưỡng của một số môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật

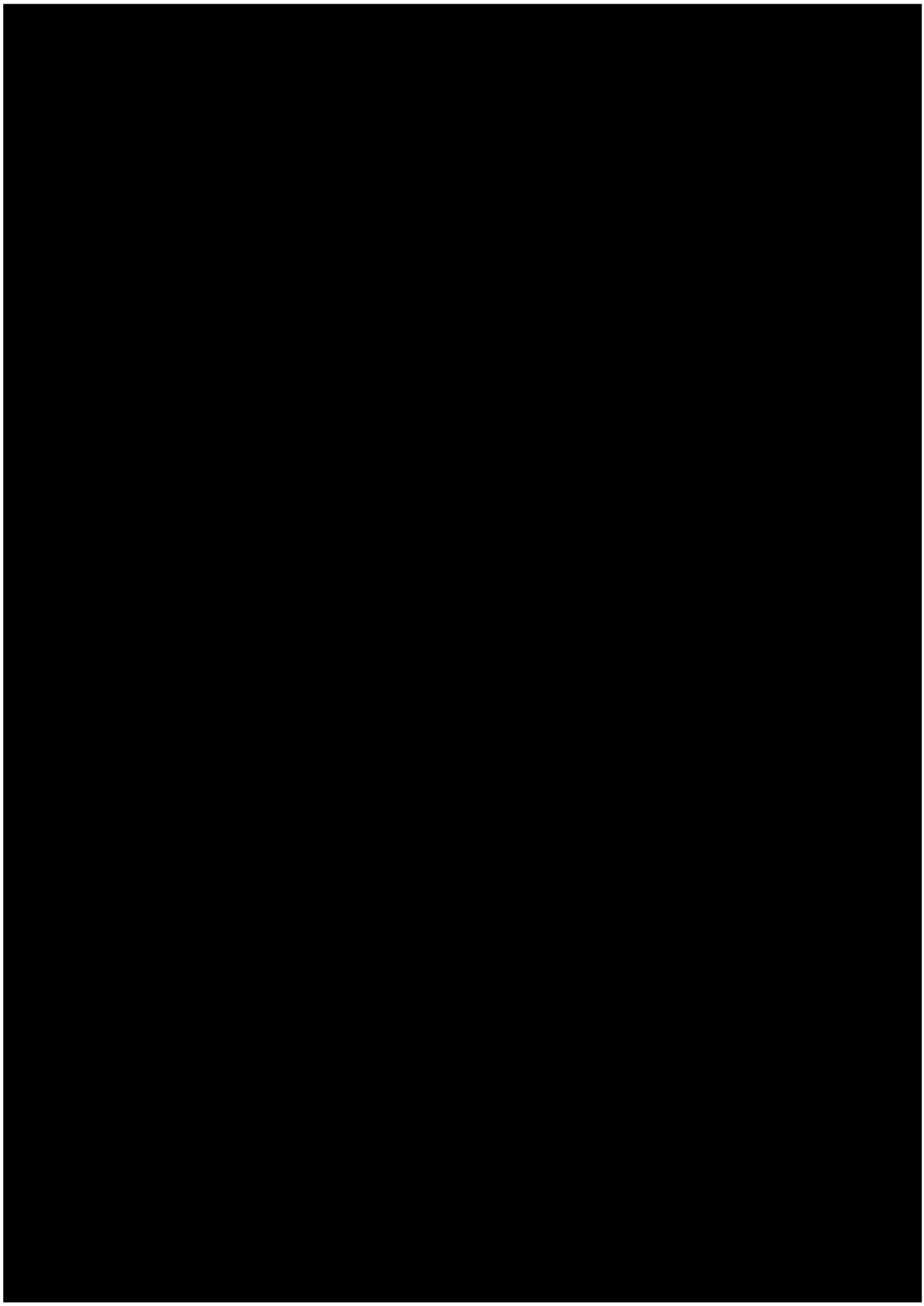
Thành phần	Nồng độ (mg/L)					
	White	MS	B5	Nitsch	N6	E1
Nguyên tố đa lượng						
$MgSO_4.7H_2O$	750	370	250	185	185	400
KH_2PO_4	-	170	-	68	400	250
$NaH_2PO_4.H_2O$	19	-	150	-	-	-
KNO_3	80	1900	2500	950	2830	2100
NH_4NO_3	-	1650	-	720	-	600
$CaCl_2.2H_2O$	-	440	150	-	166	450
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	134	-	463	-
Nguyên tố vi lượng						











nước và tráng lại bằng nước cất. Thạch khô có thể được loại bỏ bằng cách đun nóng. Các lọ nuôi cấy bằng thủy tinh và nhựa bị nhiễm bẩn phải được hấp khử trùng trước khi mở để rửa hoặc loại bỏ tương ứng, nhằm giảm thiểu sự lây lan của các chất gây ô nhiễm vi khuẩn và nấm trong phòng thí nghiệm. Các dụng cụ thủy tinh đã rửa sạch được đặt trong giỏ hoặc khay để ráo nước và sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ khoảng 60-70°C/2 giờ và bảo quản trong tủ chống bụi.

Các lọ nuôi cấy là nguồn gây ô nhiễm chính, nếu chúng đã được sử dụng lâu dài. Các lọ nuôi cấy có thể được khử trùng khô trước khi đổ môi trường để tiêu diệt vi khuẩn đó, những vi khuẩn này có thể chịu được hấp khử trùng. Các lọ nuôi cấy thường được khử trùng cùng với môi trường nuôi cấy. Đối với môi trường đã được khử trùng trước, các lọ nuôi cấy có nắp đậy thích hợp có thể được khử trùng bằng cách hấp hoặc làm nóng khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 160 - 180°C trong 3 giờ. Dụng cụ thủy tinh nên để nguội trước khi lấy ra khỏi tủ sấy.

Các nút đậy chai nuôi cấy thường làm bằng bông không thấm nước. Nút phải tương đối chặt để đảm bảo bụi không đi qua được, đồng thời nước từ môi trường không bị bốc hơi quá dễ dàng trong quá trình nuôi cấy. Bông không thấm nước là loại nút đơn giản nhất, nhưng có các nhược điểm sau:

- Nếu khi hấp nút bông bị ướt hoặc dính môi trường thì về sau sẽ bị nhiễm nấm, nhất là ở các thí nghiệm nuôi cấy trong thời gian dài;

- Thao tác làm nút bông chậm, không thuận tiện khi nuôi cấy trên quy mô lớn;

- Chỉ dùng được một vài lần, sau phải bỏ.

Hiện nay, người ta sử dụng nhiều loại nắp đậy khác thay thế nút bông. Các hãng sản xuất dụng cụ nuôi cấy mô cung cấp loại nắp ống nghiệm và bình tam giác bằng nhựa chịu nhiệt có thể hấp vô trùng ở nhiệt độ 121°C, 1 atm mà không bị biến dạng. Một số phòng thí nghiệm dùng nắp ống nghiệm inox hoặc cao su rất thuận tiện cho việc vô trùng khô hoặc ướt. Cũng có thể sử dụng giấy nhôm để làm nắp đậy. Hiên nay, sử dụng giấy nhôm làm nút đậy các chai lo nuôi cấy cũng được sử dụng vì tính tiện dụng của nó.

b. Khử trùng các thiết bị nuôi cấy

Nguồn nhiễm tạp quan trọng và thường xuyên nhất là bụi rơi vào dụng cụ thủy tinh chứa môi trường trong khi mở nắp hoặc nút bông để thao tác cấy. Người ta áp dụng nhiều biện pháp khác nhau để chống lại nguồn nhiễm tạp này.

Tủ cấy có buồng cấy với diện tích hẹp, có hai lớp cửa để tránh không khí chuyển động từ bên ngoài trực tiếp đưa bụi vào (**Hình 3.1**). Sàn và tường lát gạch men để có thể lau chùi thường xuyên. Trước khi đưa vào sử dụng, buồng cấy cần được xử lý hơi formol bằng cách rót formaldehyde (formalin) 4% ra một số nắp đĩa petri để rải rác vài nơi trong phòng cho bốc hơi tự do. Đóng kín cửa phòng cấy trong 24 giờ, sau đó bỏ formaldehyde đi và khử hơi formaldehyde thừa bằng dung dịch NH_3 25% cũng trong 24 giờ. Mặt bàn cấy, trước khi làm việc phải lau mặt bàn bằng cồn 90%.

Hình 3.1. Tủ cấy vô trùng Air clean dùng trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật (https://www.aircleansystems.com/)

Các dụng cụ cấy như kẹp, dao mổ, kim và thìa nên khử trùng trước khi sử dụng bằng cách bọc trong giấy nhôm và hấp khử trùng. Một lần nữa, trong quá trình thao tác vô trùng, các dụng cụ được khử trùng nhiều lần bằng cách nhúng vào cồn 95% và hơ lửa đèn cồn (hoặc đèn gas) và sử dụng sau khi làm mát. Một số phòng thí nghiệm sử dụng máy khử trùng bằng hạt thủy tinh (steripot), trong đó nhiệt độ tăng lên 250^0C trong vòng 5–20 phút. Nhúng dụng cụ vào các hạt được làm nóng trong 5–7 phút là đủ để khử trùng chúng. Bộ khử trùng hồng ngoại cũng được dùng để khử trùng các dụng cụ trong buồng cấy.

Trước khi cấy, kỹ thuật viên cần rửa tay bằng xà phòng và lau kỹ đến khuỷu tay bằng cồn 90%. Để đảm bảo mức độ vô trùng cao trong phòng cấy cần có một đèn tử ngoại 40W treo trên trần. Chỉ cho đèn này làm việc khi không có người trong phòng cấy. Nên bật đèn tử ngoại 30 phút trước khi cấy. Cần giảm sự chuyển động của không khí trong buồng cấy đến mức tối thiểu, vì vậy tất cả các dụng cụ phục vụ việc cấy đều phải chuẩn bị đầy đủ để trong khi cấy hạn chế đi lại, ra vào buồng cấy nhiều lần.

3.2.2.3. Khử trùng môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy mô không chỉ là nguồn gây ô nhiễm mà còn hỗ trợ sự phát triển của các vi sinh vật lây nhiễm. Do đó, nó phải được khử trùng đúng cách. Hầu hết, môi trường nuôi cấy được khử trùng bằng nồi hấp. Trong một số trường hợp, môi trương nuôi cấy được khử trùng bằng màng lọc.

a. Khử trùng bằng nồi hấp

Các môi trường nuôi cấy được pha chế và dự trữ trong điều kiện không vô trùng và đem hấp vô trùng khi đã phân phối vào các dụng cụ thủy tinh đã đậy nút hoặc nắp trong các nồi hấp vô trùng (**Hình 3.2**). Thời gian hấp từ 15 - 20 phút ở áp suất khoảng 1 atm, 121°C. Sau khi vô trùng cần phải làm khô nắp ống nghiệm hoặc nút bông.

Các dung dịch mẹ dùng để pha chế môi trường cần được bảo quản trong tủ lạnh trong khoảng thời gian nhất định. Dung dịch mẹ của hỗn hợp vitamin nên chia thành nhiều lọ nhỏ và bảo quản trong ngăn đá của tủ lạnh. Không nên pha một lượng quá lớn dung dịch mẹ các chất điều hòa sinh trưởng.

Hình 3.2. Các dạng nồi hấp vô trùng, dạng nằm đứng và nằm ngang, dùng trong nuôi cấy mô và tế bào (http://www.sturdy.com.tw/)

Ở áp suất khoảng 1 atm hầu hết các vi sinh vật có trong môi trường đều bị diệt, kể cả các vi sinh vật ở dạng bào tử. Thời gian hấp vô trùng trong nồi hấp thường từ 15 đến 20 phút.

Nồi hấp tiệt trùng có một số nhược điểm như thay đổi độ pH của môi trường và phân hủy một số thành phần môi trường. Các thành phần sau đây sẽ bị phân hủy một phần bằng nồi hấp:

- Sucrose phân hủy thành glucose, fructose. Môi trường hấp tiệt trùng với sucrose sẽ chứa một số loại đường.

- Acid gibberellic mất 90% hoạt tính của nó.

- Vitamin B1 bị phân hủy thành pyrimidine và thiazol.

- Zeatin, urê, vitamin C, colchicine và thuốc kháng sinh đều không bền với nhiệt.

- Chất chiết xuất từ thực vật mất đi một số hoạt tính của chúng.

Đôi khi ta cần cho vào môi trường nuôi cấy các chế phẩm mẫn cảm với nhiệt, có thể bị phân hủy khi ta hấp ở 121°C. Trường hợp này cần tiến hành lọc vô trùng riêng các chế phẩm đó và sau đó đưa vào môi trường đã được khử trùng.

Bảng 3.6. Thời gian khử trùng tối thiểu bằng nồi hấp vô trùng

Thể tích môi trường (mL)	Thời gian khử trùng tối thiểu ở 121°C
20 - 50	15
75	20
250 - 500	25
1000	30
1500	35
2000	40

b. Khử trùng bằng màng lọc

Hình 3.3. Một số loại màng lọc vô trùng của hãng Millipore (https://www.merckmillipore.com/INTL/en)

Phương pháp đơn giản nhất là dùng các màng lọc Millipore do hãng Millipore sản xuất hoặc dùng các phễu lọc thủy tinh xốp số 5. Hãng Millipore cung cấp màng lọc và giá đỡ bằng nhựa chịu nhiệt. Bộ lọc gồm có giá đỡ bằng loại nhựa chịu nhiệt gồm nắp và đế, vòng cao su và màng lọc. Đặt màng lọc (có kích thước lỗ 0,25 µm) trên đế, đặt vòng cao su lên và vặn chặt nắp vào đế. Gói toàn bộ bộ lọc vào trong một tờ giấy nhôm và khử trùng trong nồi áp suất ở 121°C trong 15-20 phút. Đồng thời vô trùng một bình thủy tinh để hứng dịch lọc. Dùng ống tiêm hút dịch lọc và bơm qua bộ lọc.

3.2.2.4. Khử trùng mẫu vật nuôi cấy

Mô nuôi cấy có thể là hầu hết các bộ phận khác nhau của thực vật như: hạt giống, phôi, noãn sào, đế hoa, lá, đỉnh sinh trưởng, đầu rễ, thân củ... Tùy theo sự tiếp xúc với điều kiện môi trường bên ngoài, các bộ phận này chứa ít hay nhiều vi khuẩn và nấm. Có thể tránh được nguồn lây nhiễm này bằng cách khử trùng bề mặt nguyên liệu thực vật kỹ lưỡng trước khi tnuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng. Các mô bị nhiễm nấm và vi khuẩn toàn thân thường không dùng trong nuôi cấy mô.

Phương thức vô trùng mô nuôi cấy thông dụng nhất hiện nay là dùng các hóa chất có hoạt tính diệt nấm khuẩn. Hiệu lực diệt nấm khuẩn của các chất này phụ thuộc vào thời gian xử lý, nồng độ và khả năng xâm nhập của chúng vào các kẻ ngách lồi lõm trên bề mặt mô nuôi cấy, khả năng đẩy hết các bọt khí bám trên bề mặt mô nuôi cấy.Để tăng tính linh động và khả năng xâm nhập của chất diệt khuẩn, thông thường người ta xử lý mô nuôi cấy trong vòng 30 giây trong cồn 70% sau đó mới xử lý trong dung dịch tiệt trùng. Các chất kháng sinh trên thực tế ít được sử dụng vì tác dụng không triệt để và có ảnh hưởng xấu ngay lên sự sinh trưởng của mô cấy.

Trong thời gian xử lý, mô cấy phải ngập hoàn toàn trong dung dịch diệt khuẩn. Đối với các bộ phận thực vật có nhiều bụi đất, trước khi xử lý nên rửa kỹ bằng xà phòng dưới dòng nước chảy. Khi xử lý xong, mô cấy được rửa nhiều lần bằng nước cất vô trùng (3-5 lần). Những phần trên mô cấy bị tác nhân vô trùng làm cho trắng ra cần phải cắt bỏ trước khi đặt mô cấy lên môi trường. Để tránh ảnh hưởng trực tiếp của các tác nhân vô trùng lên mô cấy, nên chú ý để lại một lớp bọc ngoài khi ngâm mô vào dung dịch diệt khuẩn. Lớp cuối cùng này sẽ được cắt bỏ hoặc bóc đi trước khi đặt mô cấy lên môi trường.

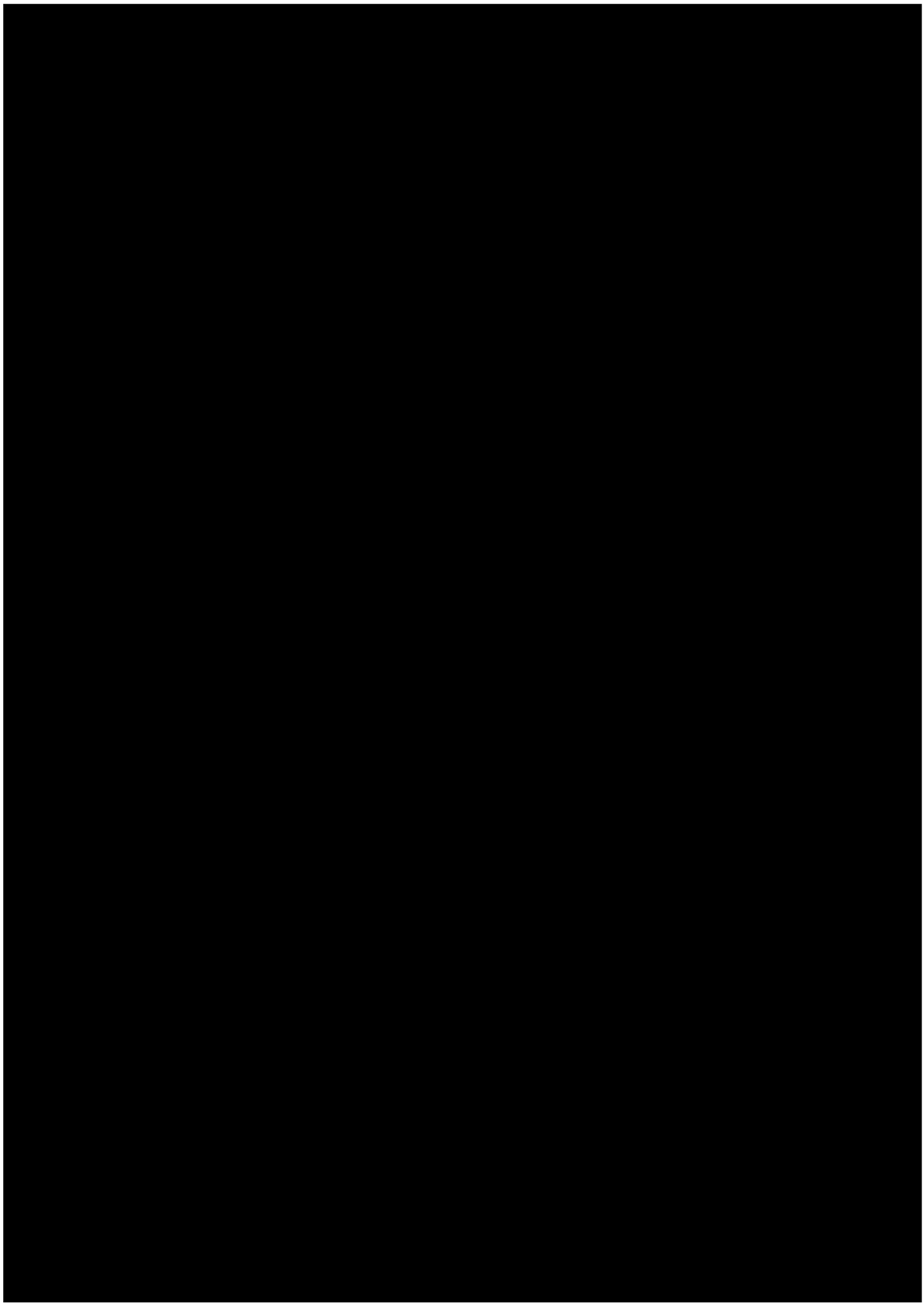
Vô trùng mô cấy là một thao tác khó, ít khi thành công ngay lần đầu tiên. Tuy vậy, nếu kiên trì tìm được nồng độ và thời gian vô trùng thích hợp thì sau vài lần thử, chắc chắn sẽ đạt kết quả.

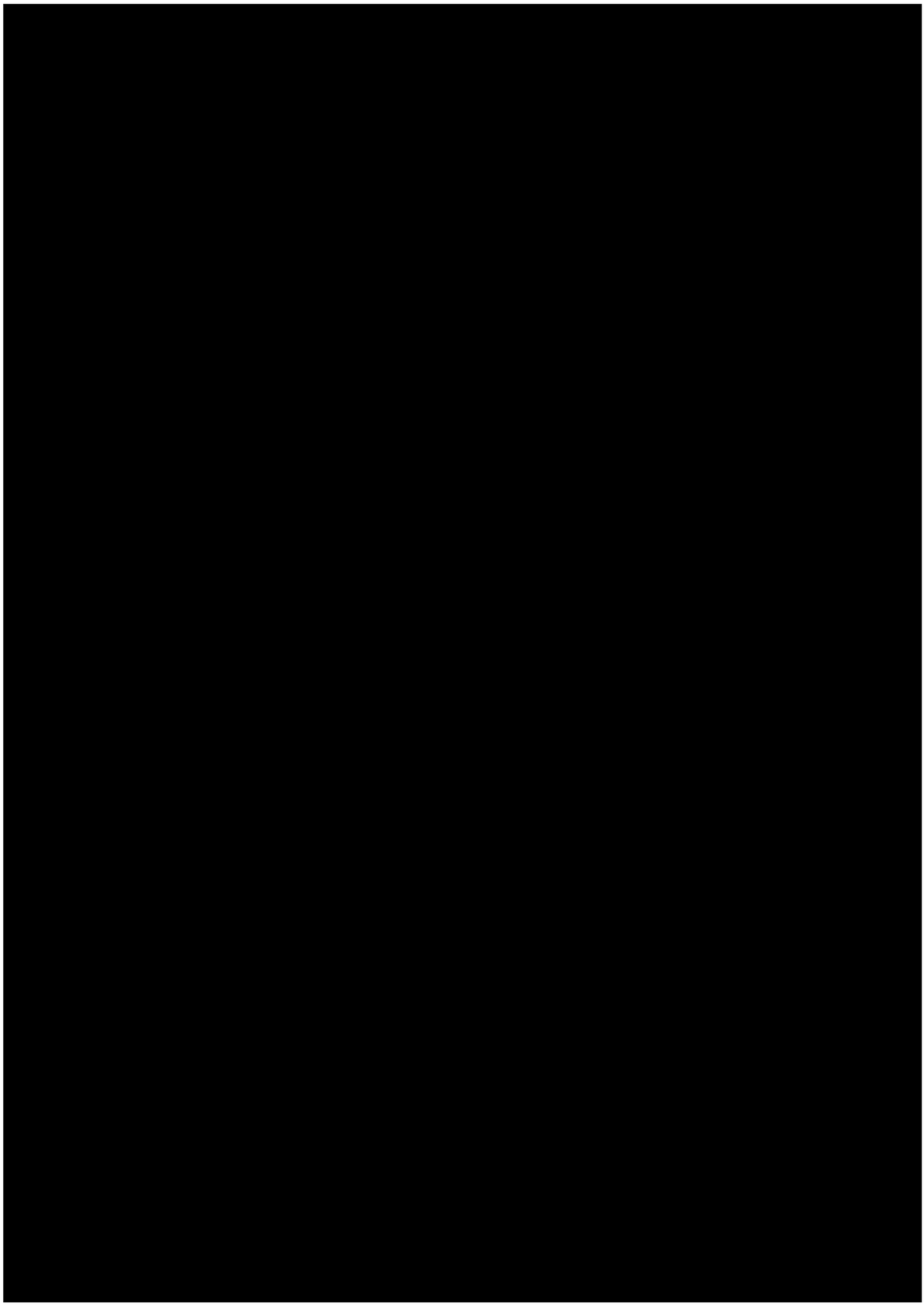
Bảng 3.7. Hiệu quả khử trùng bề mặt của một số chất vô trùng

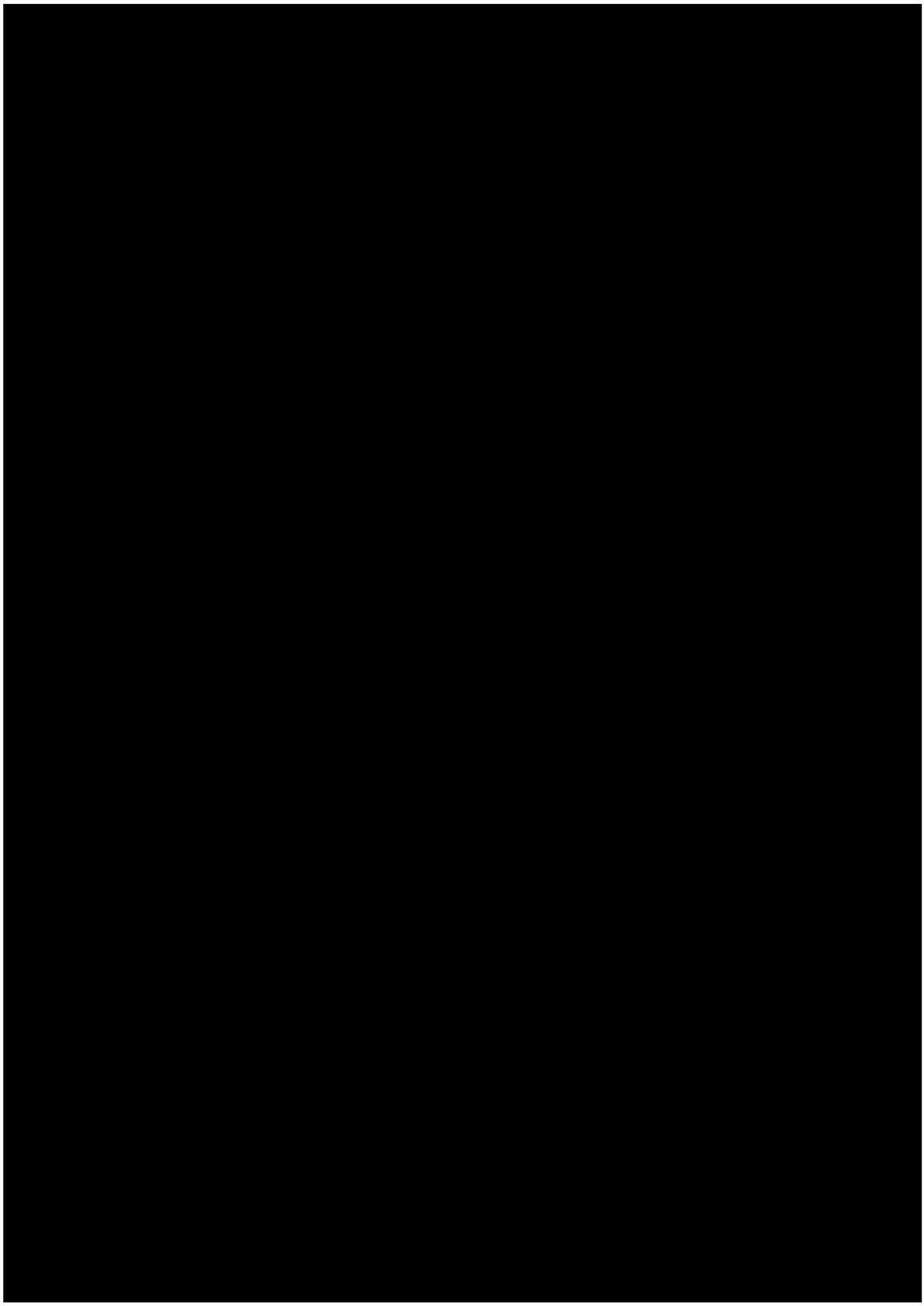
Chất vô trùng	Nồng độ	Thời gian khử trùng (phút)	Hiệu quả khử trùng
Calcium hypochlorite	9 - 10%	5 - 30	Rất tốt
Sodium hypochlorite	2%	5 - 30	Rất tốt
Nước bromine	1 - 2%	2 - 10	Rất tốt
H_2O_2	10 - 12%	5 - 15	Tốt
$HgCl_2$	0,1-1%	2 - 10	Khá
Kháng sinh	4 - 50 mg/L	30 - 60	Khá

Bên cạnh việc thực hiện đúng các điều kiện nuôi cấy trên, để đảm bảo thành công trong quá trình nuôi cấy mô và tế bào thực vật, cần lưu ý một số vấn đề sau:

- Chọn mẫu vật nuôi cấy: Các mô trong cơ thể thực vật đều có thể dùng làm mô cấy. Tuy vậy, nên lựa chọn các mô đang phát triển, thịt quả non, lá non, cuống hoa, đế hoa, mô phân sinh... khi đặt vào môi trường có chứa một lượng chất sinh trưởng thích hợp đều có khả năng phân chia và phân hóa. Để bắt đầu nghiên cứu nhân giống vô tính một cây nhất định, trước tiên người ta chú ý đến các chồi nách và mô phân sinh ngọn. Cần biết rằng tuy mang một lượng thông tin di truyền như nhau, các mô khác nhau trên cùng một cây có thể sinh trưởng và phát triển với khả năng tái sinh chồi, rễ hay cây hoàn chỉnh rất khác nhau. Vì vậy, khi khởi sự chọn giống, nhân giống một cây cụ thể bằng







CHƯƠNG 4

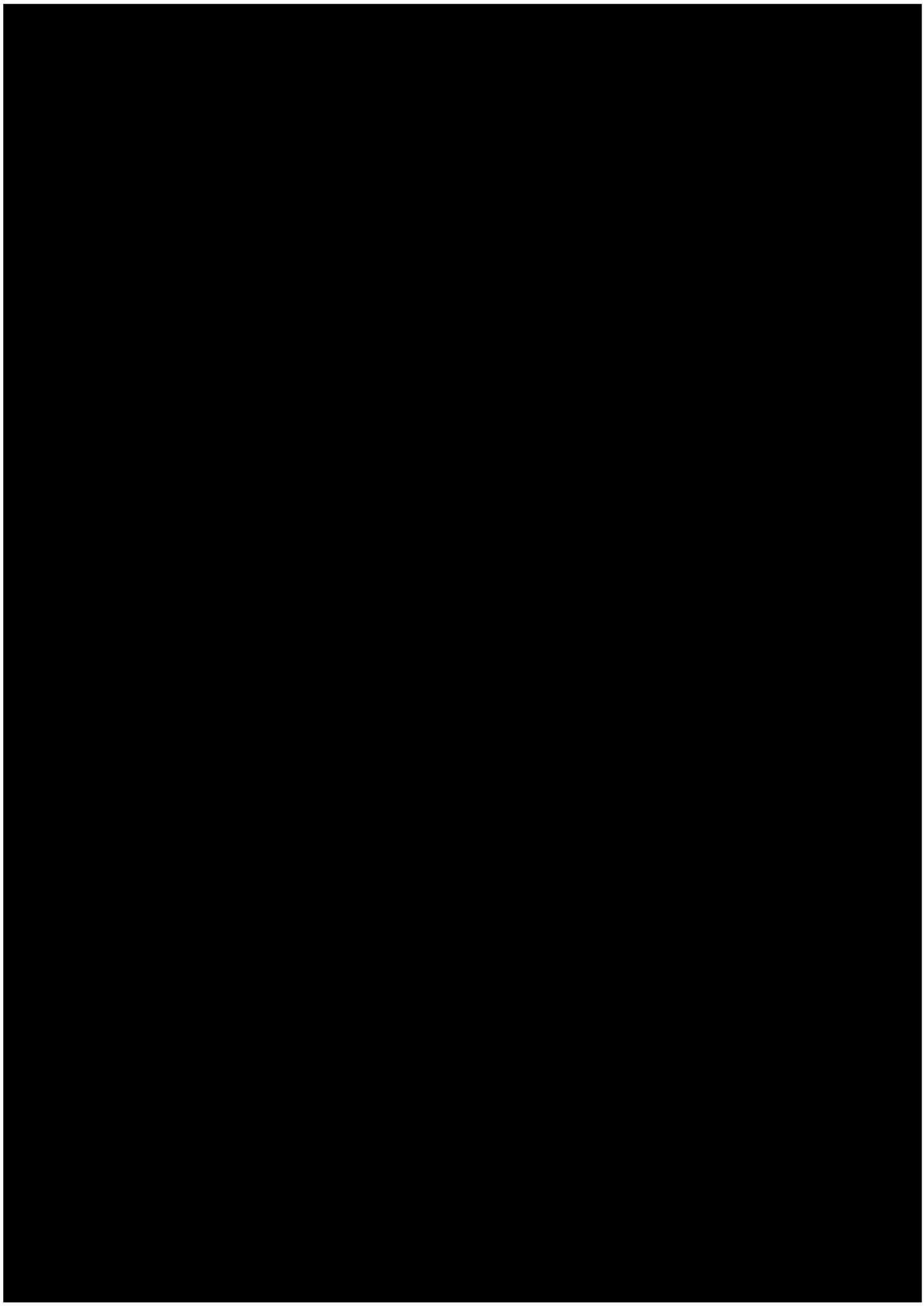
NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH *IN VITRO Ở THỰC VẬT*

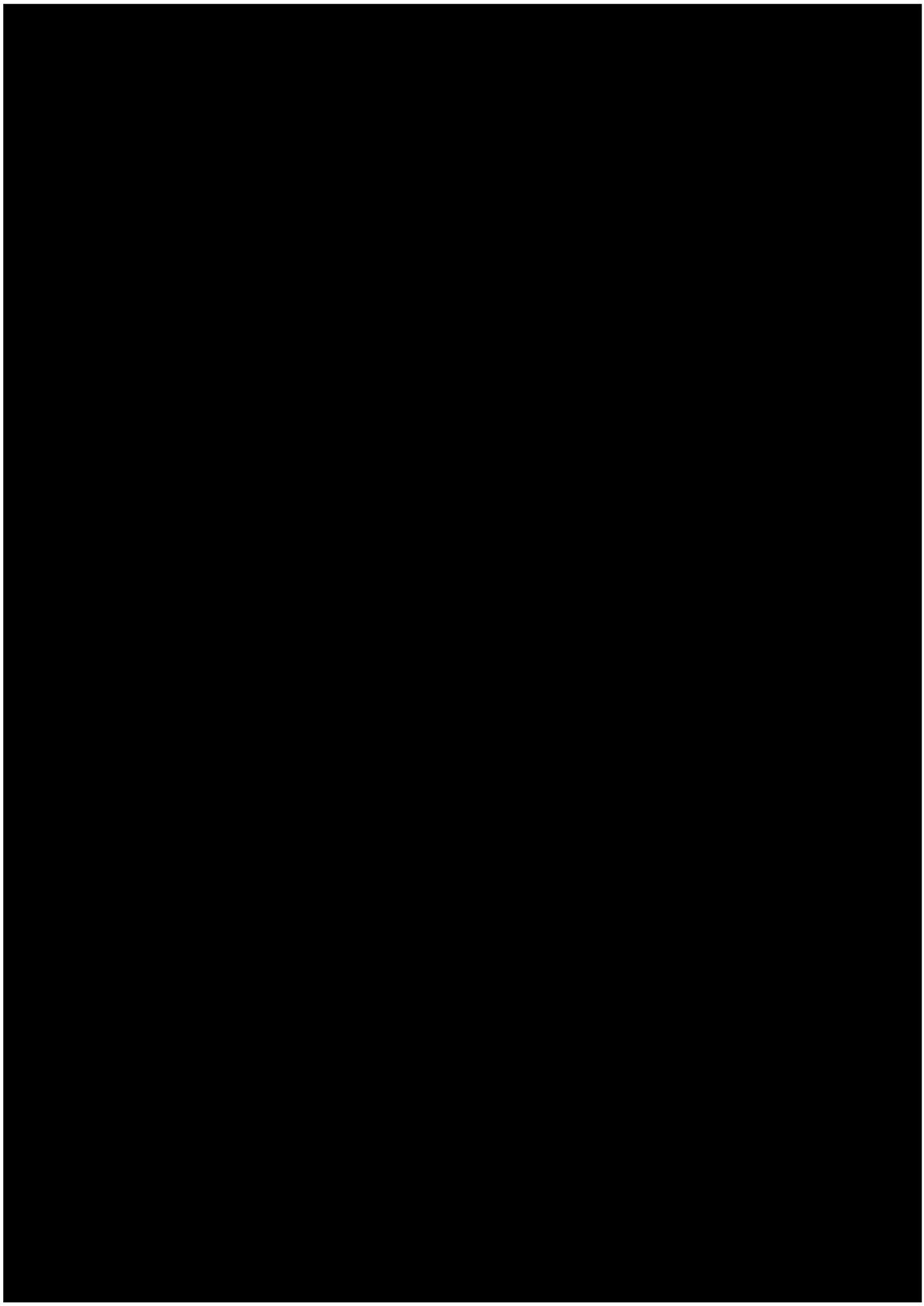
TÓM TẮT CHƯƠNG

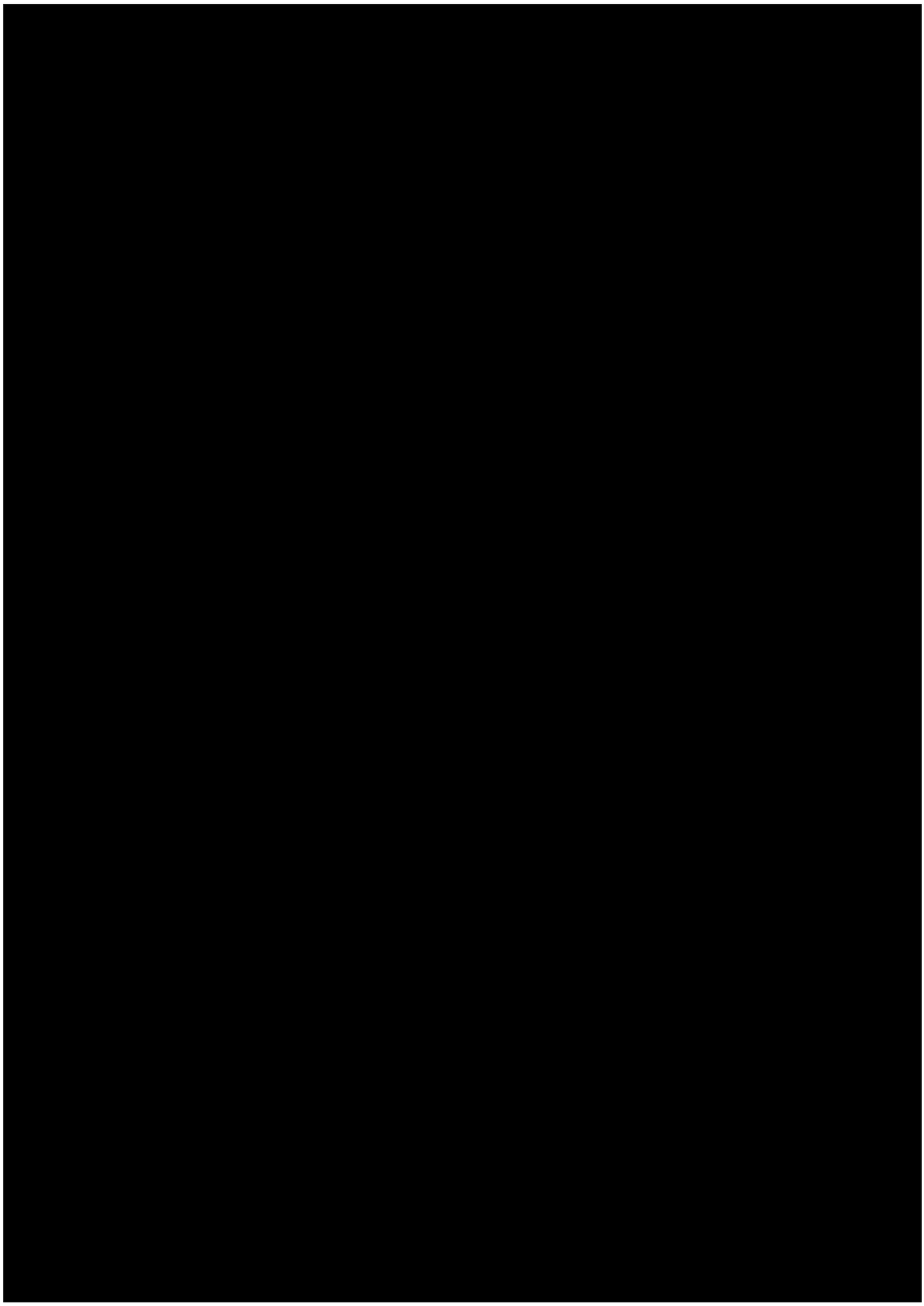
Công nghệ nhân giống in vitro được ứng dụng trong thực tiễn sản xuất và đời sống như bảo tồn và nhân nhanh các kiểu gen hiếm, nhân nhanh giống của nhiều loài cây trồng có giá trị kinh tế cao, nhân nhanh và duy trì các cá thể đầu dòng tốt, nhân nhanh các kiểu gen quý của cây lấy gỗ trong lâm nghiệp cây ăn quả, cây cảnh, nhân nhanh kết hợp với làm sạch bệnh virus, bảo tồn các tập đoàn giống nhân giống vô tính và hữu tính trong ngân hàng gen. Có nhiều con đường nhân giống in vitro thông qua phát sinh phôi vô tính, các cấu trúc sinh dưỡng và nuôi cấy callus. Nhân giống in vitro bao gồm giai đoạn chuẩn bị để cung cấp các mẫu cấy chất lượng; tạo nguyên liệu in vitro khởi đầu; nhân nhanh chồi in vitro; hình thành rễ từ chồi in vitro; và chuyển cây in vitro ra điều kiện tự nhiên. Hiện nay, bên cạnh sản xuất cây giống in vitro thông qua nuôi cấy trên môi trường đặc, hệ lên men cũng đã được phát triển để nuôi cấy tạo phôi soma và nuôi cấy rễ tơ ở nhiều loài thực vật. Trên thiết bị đó, với một số cải tiến mới phù hợp để nhân giống thành công nhiều loại phôi soma, thể chồi, cụm chồi và củ nhỏ của nhiều loài thực vật mong muốn, thúc đẩy phát triển sản xuất các loài cây trồng có giá trị kinh tế cao.

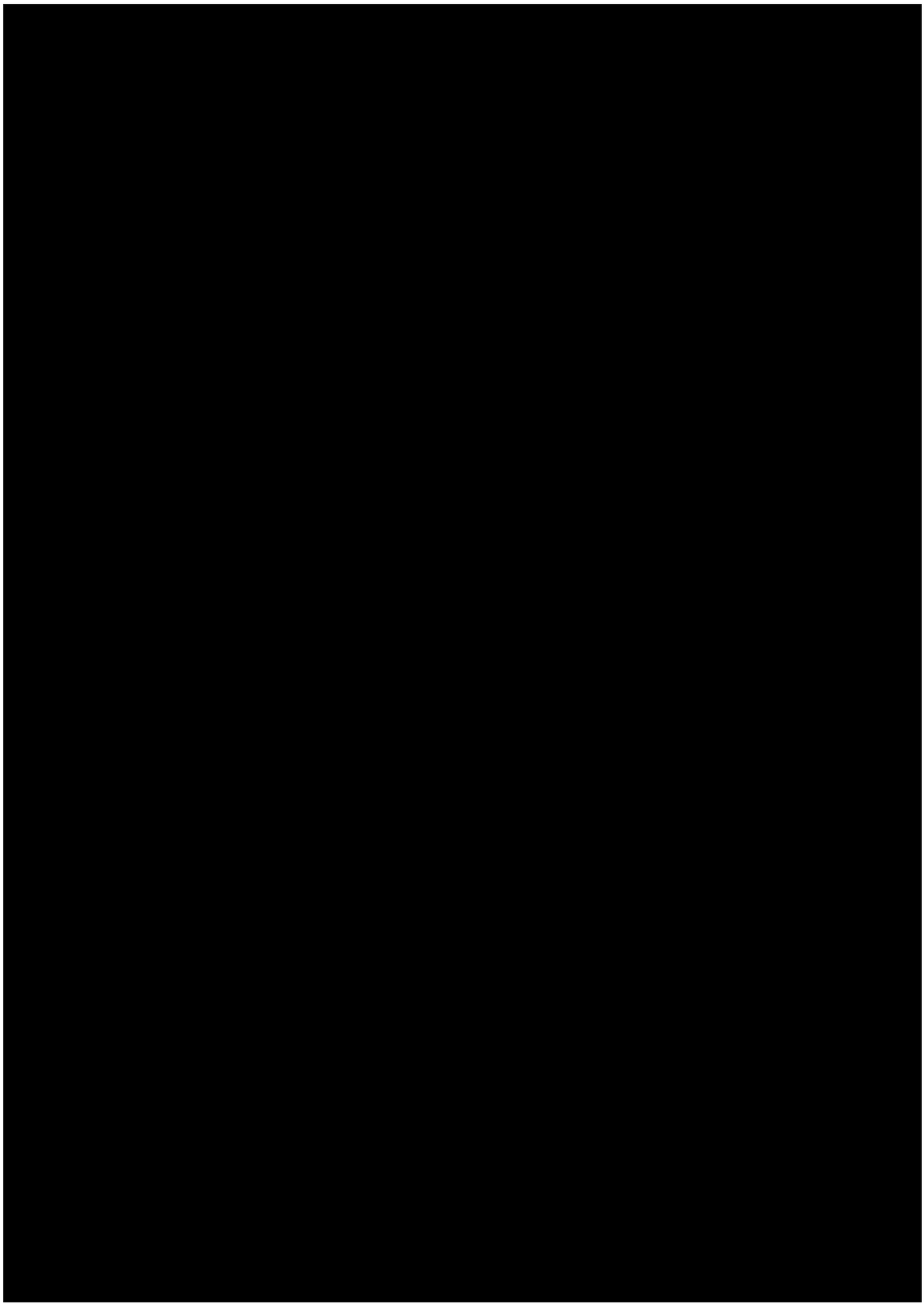
4.1. Mục đích của nhân giống vô tính *in vitro*

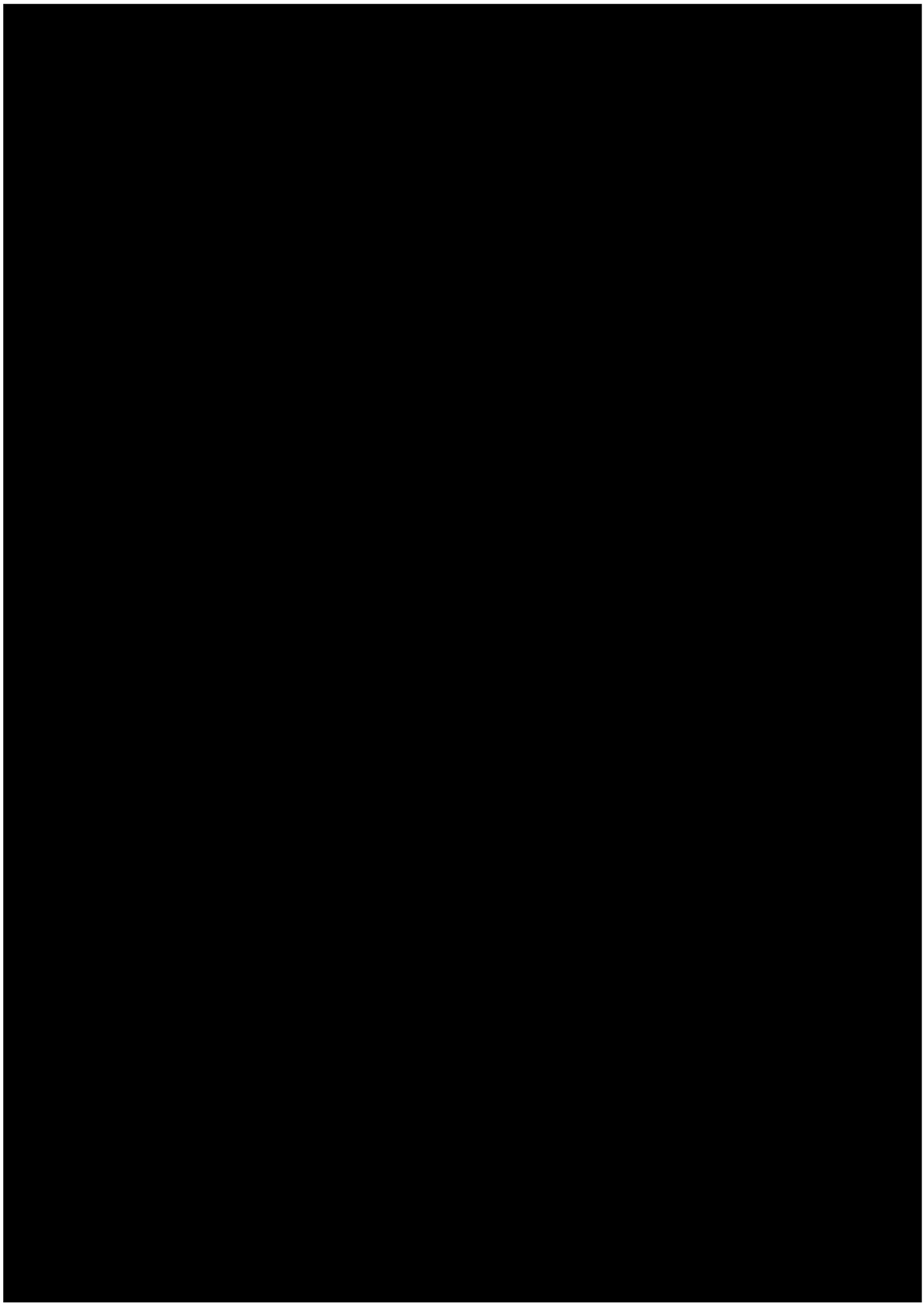
Nhân giống vô tính *in vitro* ở thực vật là một bước tiến vượt bậc của phương pháp nhân giống vô tính thông qua giâm cành, giâm chồi, chiết, ghép,… Giá trị thực tiễn của tiến bộ khoa học kỹ thuật này là đã biến những phương thức cổ điển đó thành những phương thức hoàn toàn mới về chất, giải quyết những khó khăn mà phương pháp nhân giống cổ điển không thể vượt qua. Chẳng hạn, phương pháp giâm cành chỉ có thể thực hiện thành công ở một số cây trồng nhất định; vì với kích thước mẫu từ 5-20 cm, khả năng tạo rễ phụ ở vùng mô thượng tầng hoặc khả năng đánh thức chồi phụ vẫn bị các vùng tế bào lân cận hoặc toàn bộ phần còn lại của mẫu giâm ức chế. Nếu tiến hành nuôi



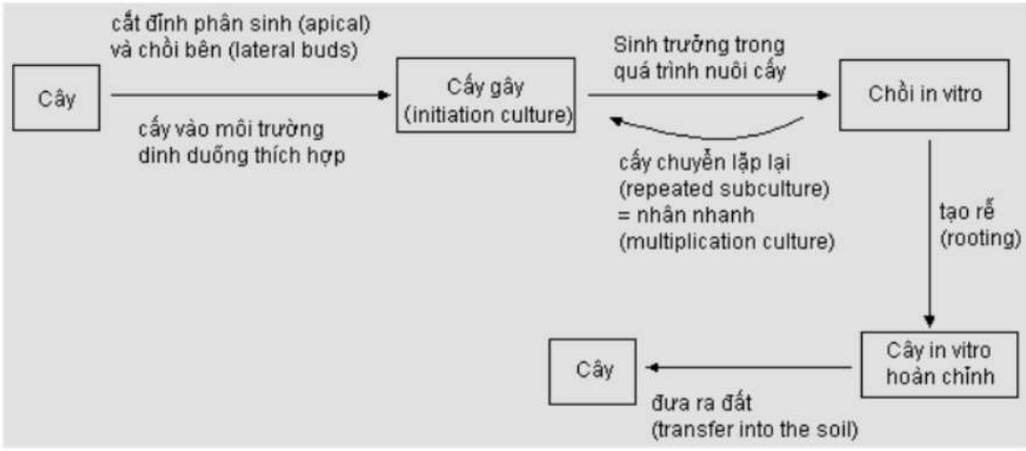








tăng, nếu độ lớn giảm thì tỷ lệ sống và tính ổn định giảm. Nhưng xét về hiệu quả kinh tế nuôi cấy (thể tích bình nuôi, lượng dung dịch môi trường dinh dưỡng): Nếu độ lớn tăng thì hiệu quả kinh tế giảm, nếu độ lớn giảm thì hiệu quả kinh tế tăng. Do đó, phải kết hợp hài hòa được các yếu tố trên để tìm ra phương thức lấy mẫu tối ưu.



Hình 4.1. Sơ đồ nuôi cấy trực tiếp tạo chồi và cây hoàn chỉnh từ mô phân sinh đỉnh

Một đỉnh sinh trưởng nuôi cấy ở điều kiện thích hợp sẽ tạo một hay nhiều chồi và mỗi chồi sẽ phát triển thành một cây hoàn chỉnh. Xét về nguồn gốc của các cây đó có ba khả năng:

- Cây phát triển từ chồi đỉnh (chồi ngọn);

- Cây phát triển từ chồi nách phá ngủ;

- Cây phát triển từ chồi mới phát sinh, ví dụ: nuôi cấy đoạn trụ dưới mầm của cây mãng cầu (*Annona squamosa*) sẽ cho xuất hiện rất nhiều mầm trên mô nuôi cấy, một số mầm sau đó sẽ phát triển thành chồi và trở thành cây *in vitro* hoàn chỉnh. Tuy nhiên, thông thường khó phân biệt được chồi phá ngủ và chồi phát sinh mới.

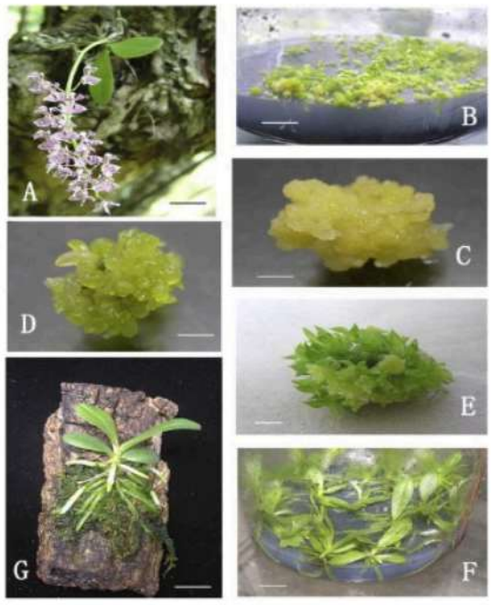
Hình 4.2. Cụm chồi *in vitro* phát sinh trực tiếp từ mẫu nuôi cấy của loài lan *Dendrobium densiflorum* Lindl (Paudel và Pant, 2013)

Các phương thức phát triển cây hoàn chỉnh từ đỉnh sinh trưởng nuôi cấy như sau:

- *Phát triển cây trực tiếp:*

Chủ yếu ở các đối tượng hai lá mầm (dicotyledon) như khoai tây, thuốc lá, cam chanh, hoa cúc…

Mầm (đỉnh sinh trưởng) → Chồi nách → Cây



Hình 4.3. Nhân giống loài lan *Nothodoritis zhejiangensis* thông qua nuôi cấy phát sinh protocorm (Zeng và cs, 2011).

Chú thích: (A) hoa lan tự nhiên, (B) hạt lan nảy mầm *in vitro*, (C và D) thể protocorm, (E) cụm chồi *in vitro*, (F) cây lan *in vitro*, (G) lan *in vitro* sinh trưởng ngoài tự nhiên.

- *Phát triển cây thông qua giai đoạn protocorm*:

Chủ yếu gặp ở các đối tượng một lá mầm như phong lan, dứa, huệ… Cùng một lúc đỉnh sinh trưởng tạo hàng loạt protocorm và các protocorm này có thể tiếp tục phân chia thành các protocorm mới hoặc phát triển thành cây hoàn chỉnh. Bằng phương thức này trong một thời gian ngắn người ta có thể thu được hàng triệu cá thể, ví dụ họ lan (Orchidaceae):

Đỉnh sinh trưởng → Protocorm → Cây

Các đối tượng hoa lan đã mang lại hiệu quả kinh tế đặc biệt cao. Sau những kết quả đầu tiên ở chi *Cymbidium* của Morel (1966) người ta đã thu được kết quả rất tốt ở 22 chi khác nhau của họ này. Sở dĩ nhân giống vô tính hoa lan đạt được thành công lớn và được ứng dụng rộng rãi như vậy là vì hoa lan có phương thức sinh sản qua protocorm. Nhờ có phương thức nhân giống nhanh và rẻ tiền mà hoa lan vốn đắt trở nên có giá phải chăng và được nhiều người ưa chuộng. Những thành công ở họ lan không những chỉ là bằng chứng mà còn mở đường cho việc ứng dụng kỹ thuật này đối với các loài cây khác.

Lĩnh vực ứng dụng mới đây nhất cũng đã bắt đầu có kết quả là các cây ăn quả và cây lâm nghiệp, trong đó có các cây quý như cà phê, táo, lê, thông, bồ đề… Tổng số có trên 30 chi khác nhau đã được nuôi cấy thành công. Vì rằng, các cây trồng rừng và các cây ăn quả là những cây trồng lâu năm nên mọi chi phí ban đầu trong nhân giống *in vitro* đều có thể chấp nhận được.

- *Ghép đỉnh chồi hay vi ghép:*

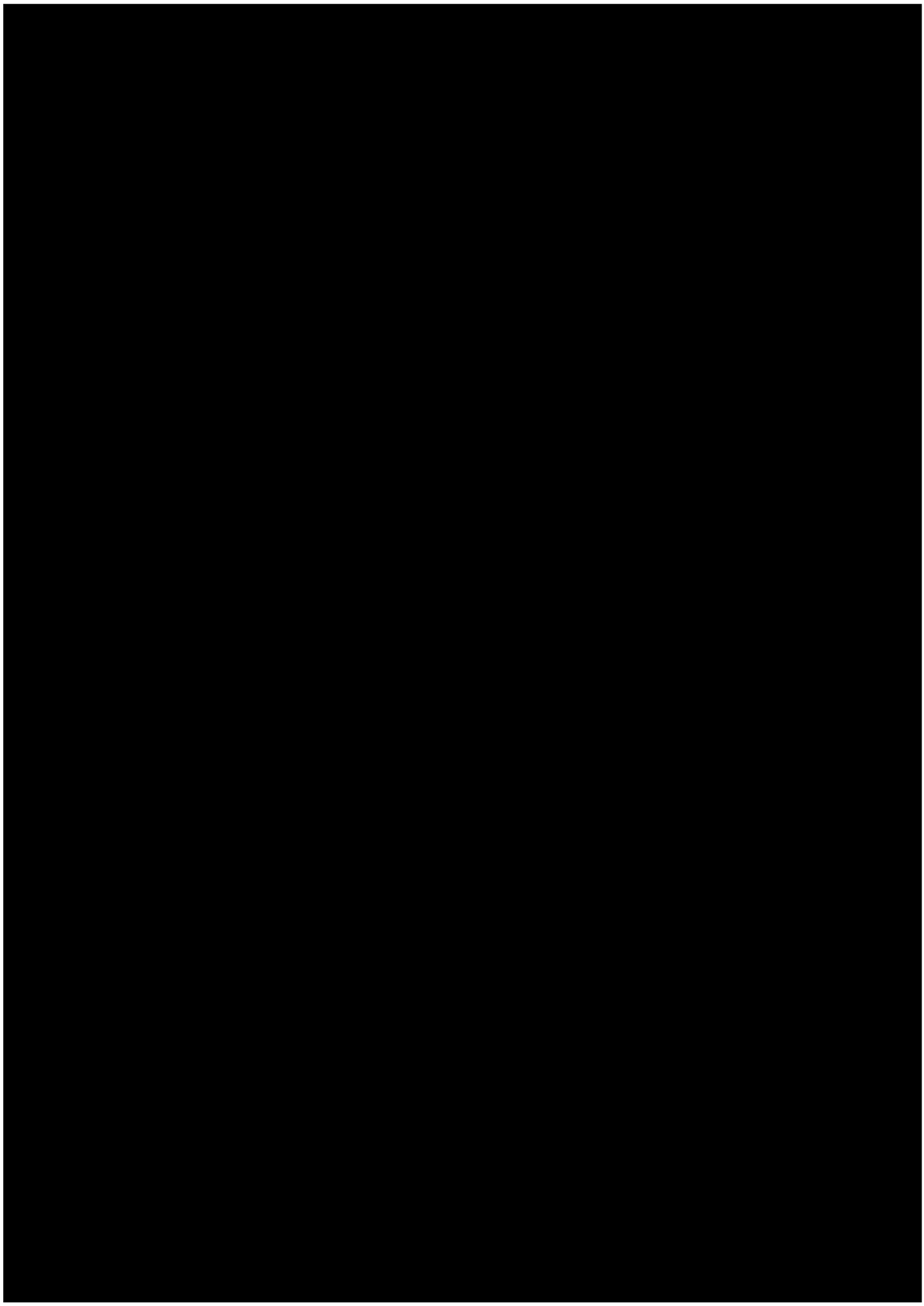
Về nguyên tắc, vi ghép là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, nhưng thông qua dinh dưỡng tự nhiên của gốc ghép. Đỉnh sinh trưởng dùng làm mắc ghép có kích thước khoảng từ 0,2-0,5 mm, được tách từ búp non đang sinh trưởng mạnh của cây mẹ trưởng thành, gốc ghép là mầm giá mới nảy mầm từ hạt của giống hoang dại, toàn bộ cây ghép được nuôi dưỡng trong điều kiện ống nghiệm vô trùng. Phương thức này thường dùng để tạo ra các giống cây ăn quả sạch bệnh virus nhằm cung cấp mắt ghép và cành chiết đầu dòng làm nguyên liệu nhân giống cho sản xuất đại trà. Phương thức này cho phép thu được cây hoàn toàn sạch bệnh và mang đặc điểm di truyền của cây mẹ cho mắt ghép.

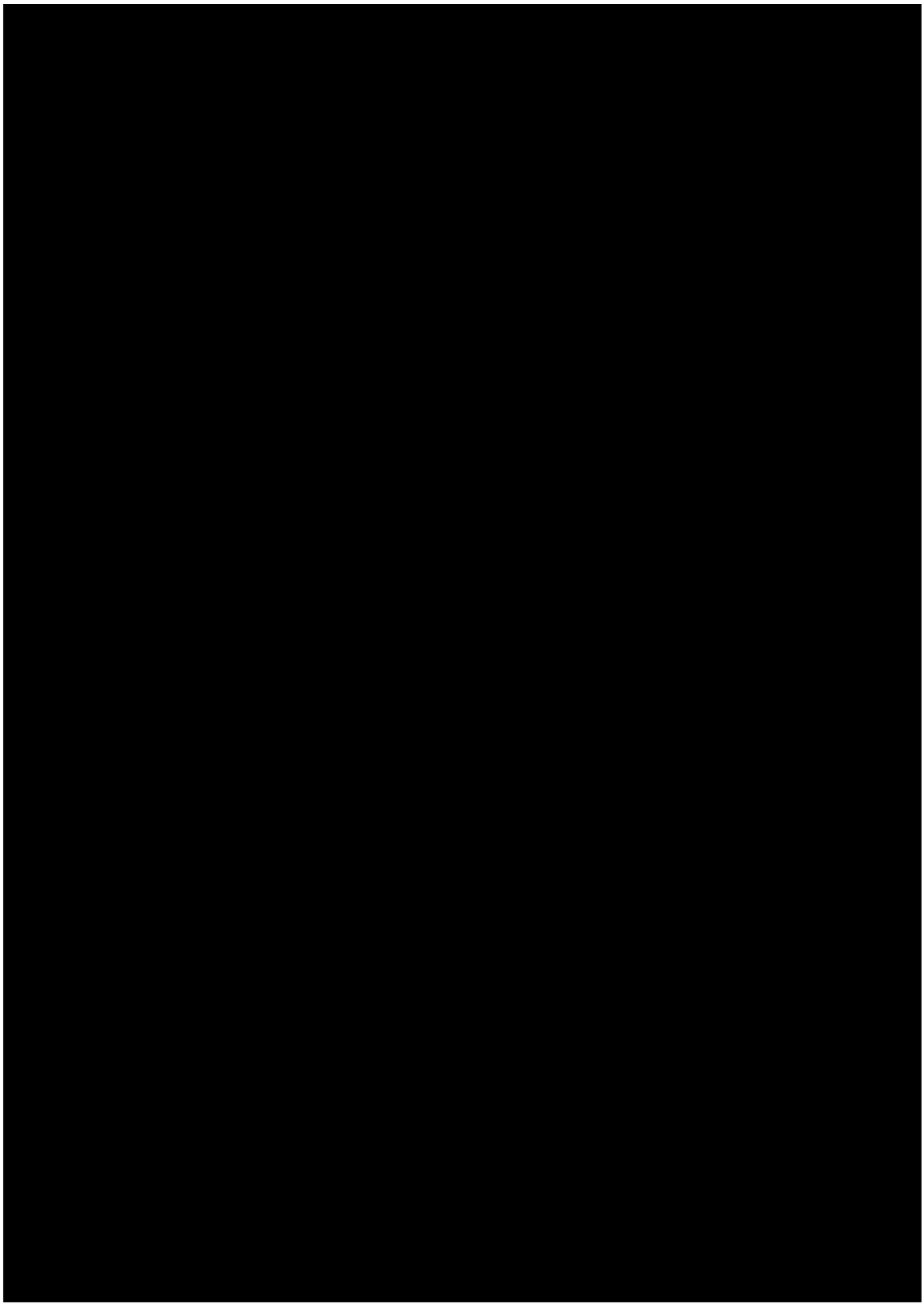
Có nhiều cách ghép khác nhau, chẳng hạn:

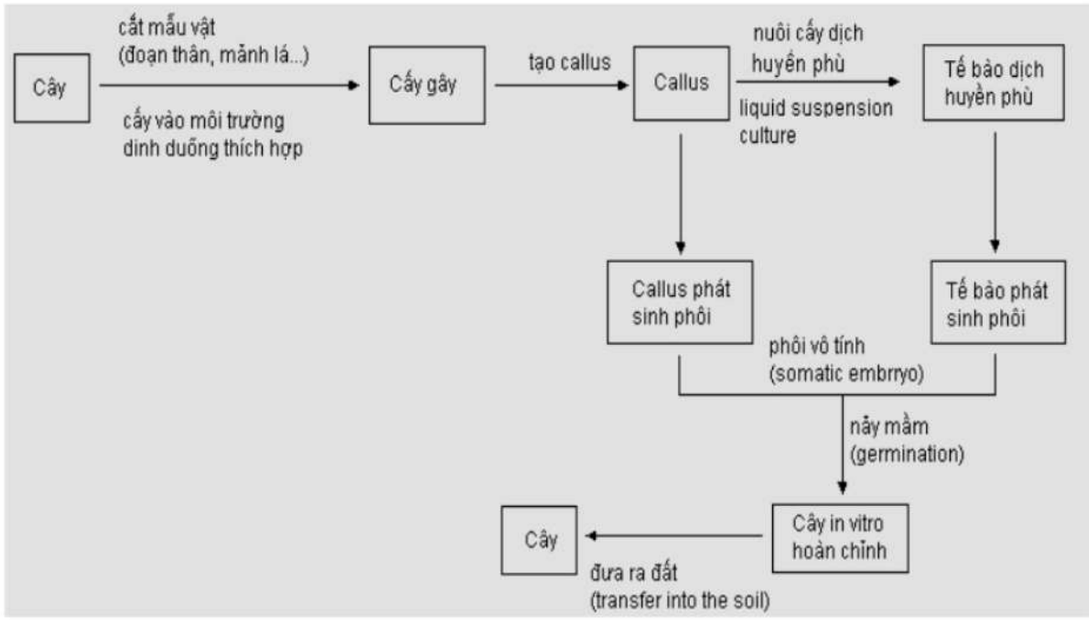
(1) Ghép lên mặt cắt: đặt mắt ghép trực tiếp lên bề mặt lát cắt, trên vùng tượng tầng;

(2) Ghép chữ T-ngược: dùng đầu nhọn của lưỡi dao cắt lỗ ghép hình chữ T-ngược, chân chữ T là mặt cắt để dễ bộc lộ vùng tượng tầng;

(3) Ghép hàm ếch: khoét trên thân mầm cách mặt cắt 5 mm một vết lõm hình hàm ếch, chiều sâu vết lõm bằng chiều dày lớp vỏ. Đặt mặt ghép vào đáy hàm ếch.

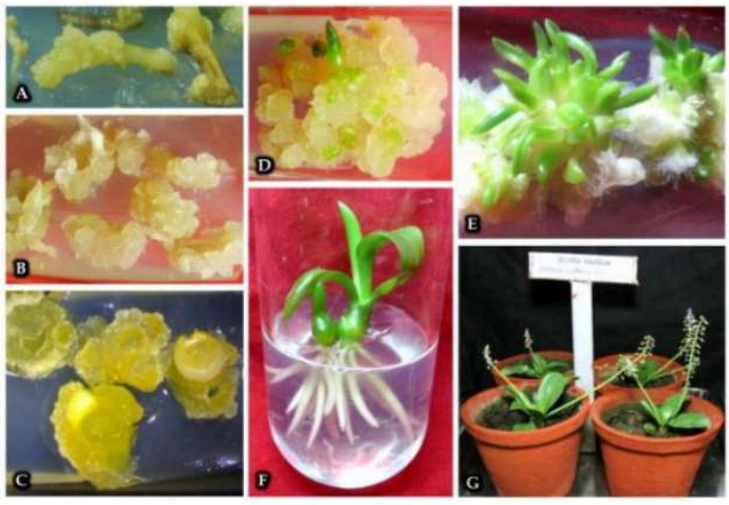






Hình 4.6. Sơ đồ mẫu nuôi cấy phát sinh callus, callus phát sinh phôi soma (hoặc huyền phù tế bào phát sinh phôi soma) và từ phôi thu được cây *in vitro*

Tế bào callus khi cấy chuyển nhiều lần sẽ không ổn định về mặt di truyền. Để tránh tình trạng đó nhất thiết phải sử dụng loại callus vừa phát sinh, tức là callus sơ cấp để tái sinh cây thì hy vọng sẽ thu được cây tái sinh đồng nhất. Thông qua giai đoạn callus còn có thể thu được những cá thể sạch virus như trường hợp ở tỏi.



Hình 4.7. Nuôi cấy tạo chồi *in vitro* thông qua nuôi cấy callus của cây *Ledebouria revoluta* (Haque và cs, 2018)

Chú thích: Callus được cảm ứng từ các loại mẫu cấy (A, B, C) và sau đó đã tái sinh chồi (D, F)

4.4. Quy trình nhân giống vô tính *in vitro*

Nhân giống *in vitro* là một quá trình gồm 5 bước được xác định rõ, mỗi bước có những yêu cầu và vấn đề cụ thể (Razdan, 1996). Các giai đoạn gồm: Giai đoạn chuẩn bị mẫu nuôi cấy; giai đoạn tạo nguyên liệu *in vitro* khởi đầu; giai đoạn nhân nhanh chồi; giai đoạn hình thành cây *in vitro*; và giai đoạn huấn luyện cây *in vitro* ở điều kiện vườn ươm.

4.4.1. Giai đoạn chuẩn bị mẫu nuôi cấy

Bước này ban đầu được đưa ra để kiểm tra vấn đề nhiễm bẩn vi sinh vật, đặc biệt là nấm, nhưng hiện nay bước này được coi là quan trọng đối với sự thành công của việc thiết lập và nhân giống ở giai đoạn 1 và 2. Bất kỳ biện pháp nào được thực hiện để cải thiện chất lượng của cây mẹ, cho dù liên quan đến tình trạng nhiễm khuẩn hay sinh lý của nó, đều được đưa vào giai đoạn này. Sự nhiễm bẩn là một trong những vấn đề nghiêm trọng ở khi đưa mẫu vào nuôi cấy và để thiết lập thành công nuôi cấy vô trùng việc vô trùng mẫu của cây mẹ là rất quan trọng. Mẫu sử dụng nuôi cấy nên thu từ cây trồng trong nhà kính thì tốt hơn. Các cây cho mấu nên được tưới ít để giảm thiểu vấn đề nhiễm vi sinh vật trong quá trình khởi đầu nuôi cấy, sẽ làm giảm yêu cầu về các biện pháp khử trùng mạnh và tăng số lượng các mẫu nuôi cấy khỏe mạnh. Duy trì cây mẹ cho mẫu trong môi trường sạch của nhà kính cho phép sử dụng tất cả các chồi nách và chồi ngọn để thiết lập nuôi cấy vô trùng.

Giai đoạn chuẩn bị nguyên liệu cũng có thể bao gồm việc kiểm soát các thông số như ánh sáng và nhiệt độ mà theo đó cây mẹ được duy trì và việc áp dụng các chất điều hoà sinh trưởng có thể ảnh hưởng đến phản ứng của các mẫu cấy ở các giai đoạn sau. Dạ yến thảo được trồng dưới ánh sáng đỏ, phân nhánh nhiều, và mẫu lá thu được từ những cây như vậy tạo ra nhiều chồi hơn gấp ba lần so với lá thu được từ cây không được xử lý. Một số cây cần tiền xử lý nhiệt độ để có phản ứng tốt hơn trong ống nghiệm.

4.4.2. Giai đoạn tạo nguyên liệu in vitro khởi đầu

Giai đoạn này còn gọi là cấy gây. Mục đích của giai đoạn này là thiết lập môi trường nuôi cấy vô trùng để nhân giống bằng cách sử dụng các mẫu thích hợp. Mặc dù khó đạt được 100% mẫu cấy không nhiễm trùng nhưng tỷ lệ mẫu nuôi cấy vô trùng nhiều có khả năng tái sản xuất cao là mong muốn đối với một quy trình nhân giống *in*

vitro. Thành công ở giai đoạn này phụ thuộc vào việc lựa chọn đúng mẫu cấy, quy trình khử trùng thích hợp và ngăn chặn bất kỳ phản ứng quá mẫn cảm nào của mẫu nuôi cấy.

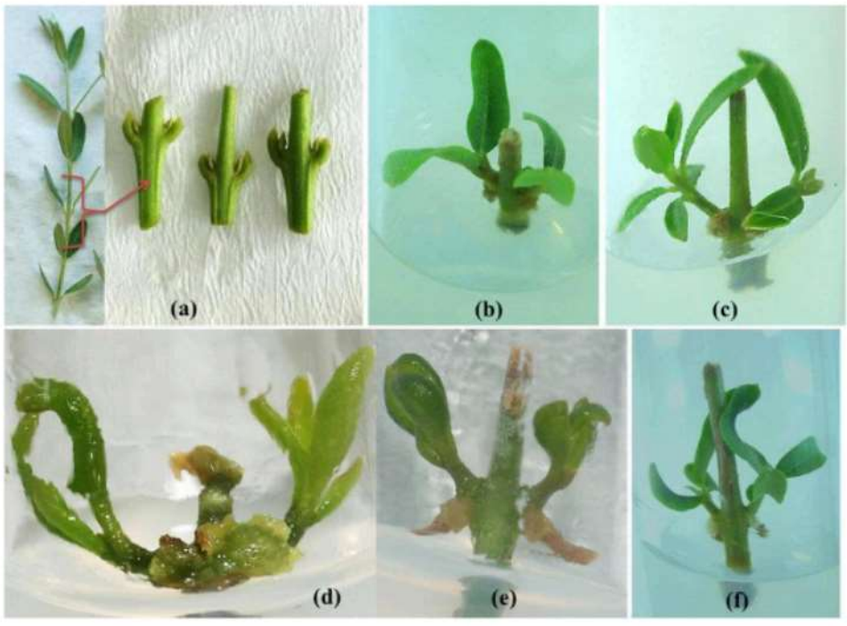
Mẫu thực vật dùng trong nuôi cấy mô có thể là hầu hết các cơ quan hay bộ phận của cây. Tùy theo điều kiện tiếp xúc với môi trường mà các mẫu thực vật có chứa ít hay nhiều mầm bệnh. Vì vậy trước khi tiến hành nhân giống *in vitro* cần phải chọn lọc cẩn thận các cây cho nguồn mẫu nuôi cấy. Các cây này cần phải khỏe mạnh, không bị bệnh. Việc lựa chọn mẫu cũng cần phải căn cứ vào trạng thái sinh lý và tuổi của mẫu . Mẫu non có mức độ nhiễm mầm mầm bệnh ít hơn, phản ứng với môi trường nhanh, dễ tái sinh, đặc biệt là tron nuô cấy callus, phôi. Đưa mẫu vật từ bên ngoài vào nuôi cấy vô trùng phải đảm bảo những yêu cầu sau:

- Tỷ lệ nhiễm thấp;

- Tỷ lệ sống cao;

- Tốc độ sinh trưởng nhanh.

Kết quả bước cấy gây này phụ thuộc rất nhiều vào cách lấy mẫu. Quan trọng nhất vẫn là đỉnh sinh trưởng, chồi nách, sau đó là đoạn hoa tự, hoa, đoạn thân, mảnh lá, rễ… Chọn đúng phương pháp khử trùng sẽ đưa lại tỷ lệ sống cao và môi trường dinh dưỡng thích hợp sẽ đạt được tốc độ sinh trưởng nhanh.



Hình 4.8. Nuôi cấy tạo nguyên liệu *in vitro* khởi đầu của cây *Olea europaea* L. (Bayraktar và cs, 2020)

Chú thích: (a) đoạn thân có mắt lá, (b, c , d, e, f) chồi hình thành từ mắt lá.

Một số dạng môi trường dinh dưỡng phổ biến:

- Muối khoáng: Theo White (1943), Heller (1953), Murashige và Skoog (1962).

- Chất hữu cơ:

+ Đường sucrose 1 - 6%.

+ Vitamin: B_1, B_6, *myo*-inositol, nicotinic acid.

+ Acid amin: Arg, asp, asp-NH_2, glu, glu-NH_2, Tyr.

+ Chất điều hoà sinh trưởng:

- Nhóm auxin: IAA, IBA, NAA, 2,4-D.

- Nhóm cytokinin: BAP, kinetin, 2-iP, zeatin.

- Nhóm gibberellin: GA_3.

Tùy theo từng loài, từng bộ phận nuôi cấy và từng mục đích nuôi cấy mà bổ sung các hàm lượng và thành phần phytoprotoplast khác nhau.

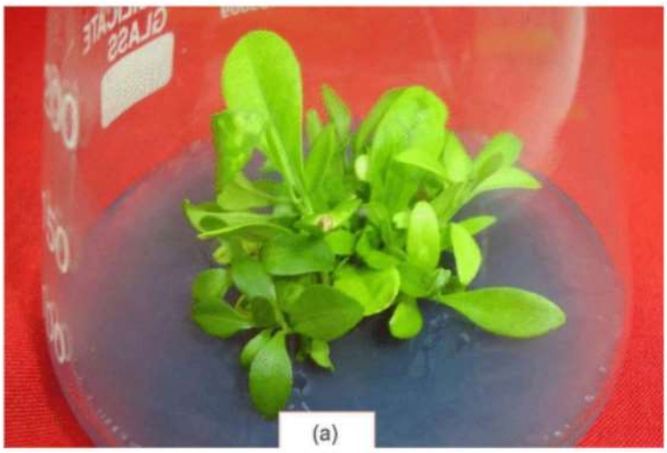
4.4.3. Giai đoạn nhân nhanh chồi in vitro

Sự thành công của quy trình vi nhân giống phần lớn phụ thuộc vào hiệu quả của giai đoạn này. Nhân chồi đạt được thông qua: (i) tái sinh từ callus, (ii) hình thành chồi ngẫu nhiên trực tiếp từ mẫu cấy và (iii) phân nhánh cưỡng bức ở nách lá. Trong giai đoạn này cần nghiên cứu các tác nhân kích thích phân hóa cơ quan, đặc biệt là chồi như:

- Bổ sung tổ hợp phytoprotoplast mới (tăng cytokinin giảm auxin).

- Tăng cường thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, tối thiểu 1000 lux. Trong thực tế nghiên cứu, người ta nhận thấy khó tách biệt ảnh hưởng của chu kỳ chiếu sáng khỏi ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng. Ánh sáng tím là thành phần quan trọng kích thích phân hóa mạnh. Ánh sáng đỏ có ảnh hưởng giống cytokinin, nó tạo nên sự tích lũy cytokinin trong mô của một số loài, chính lượng cytokinin này đã góp phần kích thích quá trình phát sinh cơ quan và tạo chồi từ những mô nuôi cấy *in vitro*.

- Bảo đảm chế độ nhiệt độ trong khoảng 20 - 30°C. Trường hợp những loài có nguồn gốc nhiệt đới, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp vào khoảng từ 32 - 35°C. Ngược lại, đối với những loài hoa ở vùng ôn đới nhiệt độ thích hợp cho quá trình tạo cụm chồi phải < 30°C.



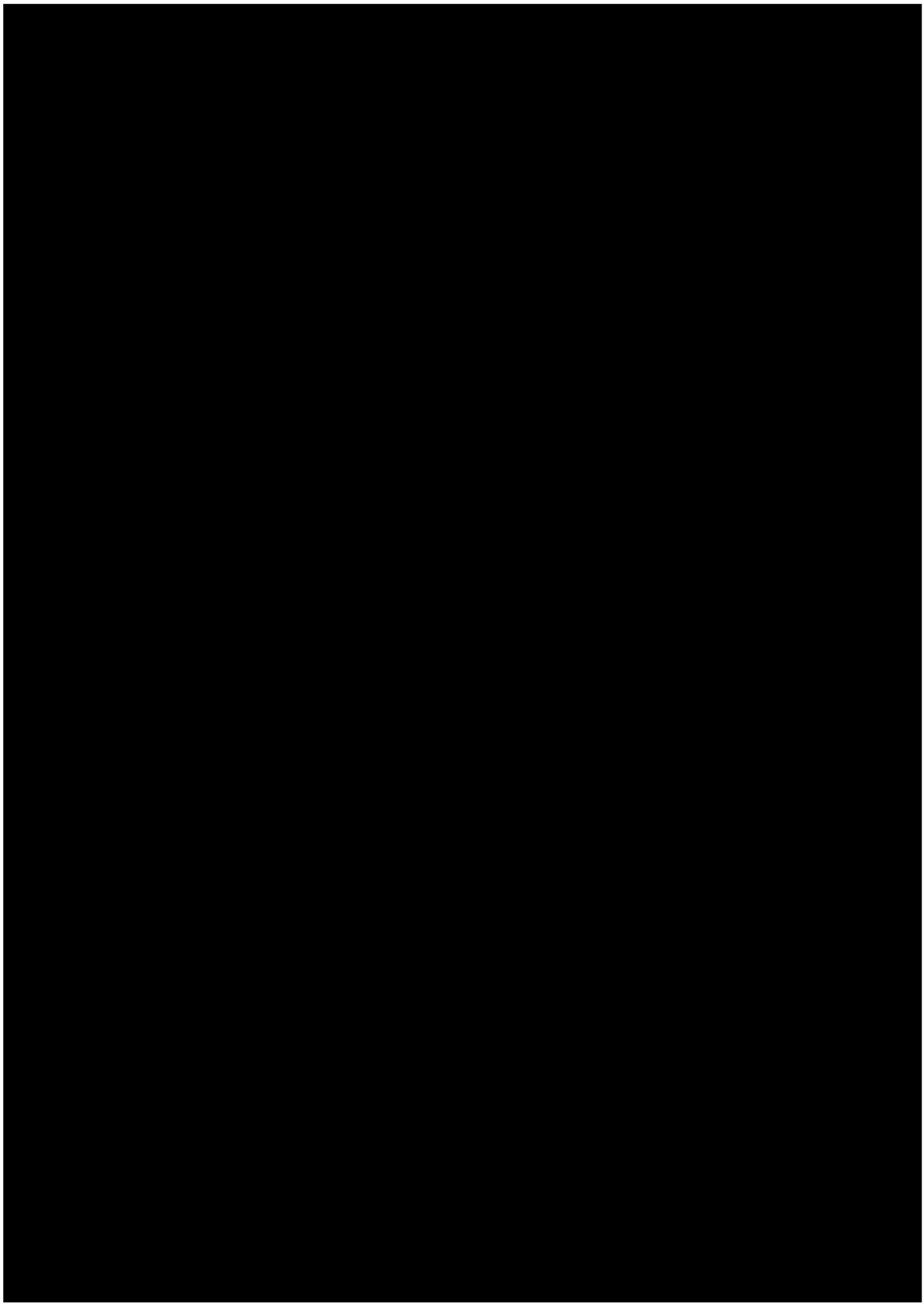
Hình 4.9. Nhân nhanh cụm chồi in vitro cây *Citrus reticulata* từ đoạn thân có mắt chồi (Siwach và cộng sự 2012)

Mục tiêu quan trọng nhất của giai đoạn này là xác định được phương thức nhân nhanh nhất bằng môi trường dinh dưỡng và điều kiện môi trường tối thích.

4.4.4. Giai đoạn hình thành cây in vitro

Phôi soma là cấu trúc lưỡng cực với rễ và mầm chồi và do đó có thể nảy mầm để tạo thành cây hoàn chỉnh. Tuy nhiên, các chồi được hình thành thông qua quá trình tái sinh từ callus, sự hình thành chồi ngẫu nhiên trực tiếp hoặc sự phân nhánh cưỡng bức ở nách lá đòi hỏi phải có thêm một bước tạo rễ để hình thành cây hoàn chỉnh. Trong một số trường hợp, các chồi được hình thành trong ống nghiệm bằng bất kỳ phương pháp nào trong ba phương pháp được mô tả ở trên, tiếp xúc liên tục với cytokinin, có thể vẫn ngắn và cần một bước kéo dài trung gian trước khi chuyển sang môi trường tạo rễ.

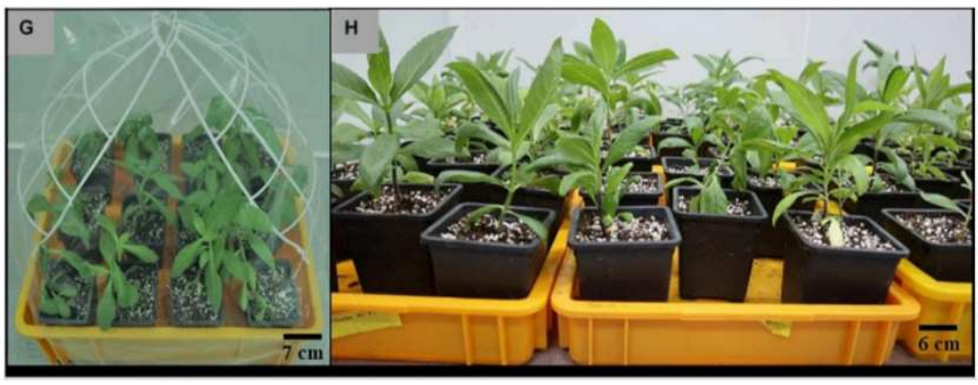
Giai đoạn này bao gồm quá trình kéo dài chồi để đạt kích thước thích hợp và tạo rễ, tức là quá trình tạo cây hoàn chỉnh. Môi trường lúc này không cần bổ sung cytokinin mà có thể chỉ bổ sung auxin. Đối với một số loài, mô/chồi khi đạt kích thước thích hợp thì rễ tự phát sinh không cần phải bổ sung auxin. Tuy nhiên đối với một số loài đặc biệt là các loài thân gỗ thì việc bổ sung auxin là rất cần thiết. Nồng độ auxin tối ưu được xác



trưởng, độ ẩm cao, ánh sáng yếu và trao đổi khí kém. Cây *in vitro* có thể sinh trưởng và phát triển tốt nhưng chịu nhiều bất thường về hình thái, giải phẫu, tế bào học và sinh lý học, đòi hỏi chúng phải thích nghi cẩn thận với các điều kiện tự nhiên. Hai bất thường chính của những cây này là chế độ dinh dưỡng dị dưỡng do môi trường nuôi cấy giàu chất dinh dưỡng hữu cơ và kiểm soát mất nước kém.

Đây là giai đoạn quan trọng bao gồm việc huấn luyện thích nghi với thay đổi nhiệt độ, độ ẩm, sự mất nước, sâu bệnh và chuyển từ trạng thái dị dưỡng sang tự dưỡng hoàn toàn. Giai đoạn này thường bị bỏ qua một cách thiếu căn cứ. Các nghiên cứu về cấu trúc của lá khoai tây nuôi cấy *in vitro* và so sánh với lá cây khoai tây trồng bên ngoài cho thấy chúng rất khác nhau. Điều đó chứng tỏ phải tiến hành thích nghi dần dần cây nhân giống *in vitro* với điều kiện tự nhiên. Quá trình thích nghi ở đây phải được hiểu là quá trình thay đổi những đặc điểm sinh lý và giải phẫu của bản thân cây non đó. Thời gian tối thiểu cho sự thích nghi là 2 - 3 tuần, trong thời gian này cây phải được chăm sóc và bảo vệ trước những yếu tố bất lợi sau:

- Mất nước nhanh làm cho cây bị héo khô;
- Nhiễm vi khuẩn và nấm gây nên hiện tượng thối nhũn;
- Cháy lá do nắng.



Hình 4.11. Cây con *Aspilia africana in vitro* được thích nghi và trồng trên cơ chất trong điều kiện vườn ươm (Okello và cs, 2021)

Nguyên tắc chi phối quá trình thích nghi của thực vật *in vitro*, chúng có thói quen phát triển trong điều kiện dị dưỡng độ ẩm cao và ánh sáng yếu thì làm cho chúng phát triển trong điều kiện tự dưỡng độ ẩm thấp và ánh sáng cao. Cây *in vitro* mất khoảng 4 - 6 tuần để cứng cây, có thể sống sót trong điều kiện bình thường. Các cây *in vitro* giống

được lấy ra khỏi môi trường thạch, rửa sạch rễ để loại bỏ thạch và trồng vào chậu có chứa hỗn hợp giá thể thích hợp (than bùn, vermiculite, đá trân châu, hạt polystyrene hoặc phân hữu cơ dừa). Cây được tưới bằng dung dịch dinh dưỡng dịu nhẹ như dung dịch Knop hoặc dung dịch muối khoáng ¼ MS. Phương pháp đơn giản nhất để duy trì độ ẩm cao xung quanh cây *in vitro* khi trồng ra đất, là bọc chúng bằng túi nhựa có đục lỗ nhỏ để lưu thông không khí. Cây được duy trì trong bóng râm hoặc ánh sáng yếu trong khoảng 15 - 20 ngày và dần thích nghi với điều kiện độ ẩm thấp bằng cách dỡ bỏ các túi nilong trong vài giờ/ngày, từ những ngày đầu và tăng dần thời gian tiếp xúc cho đến khi cây có thể chịu được việc dỡ bỏ hoàn toàn lớp che phủ. Thực vật trong giai đoạn này cứng cáp hơn để tồn tại nhờ dinh dưỡng vô cơ và bộ máy quang hợp của chúng được kích hoạt trở lại để thực hiện quá trình tự dưỡng. Cây chỉ có thể tồn tại trong điều kiện tự nhiên khi rễ và lá mới được hình thành.

4.5. Sản xuất cây giống *in vitro* thực vật trong hệ thống phản ứng

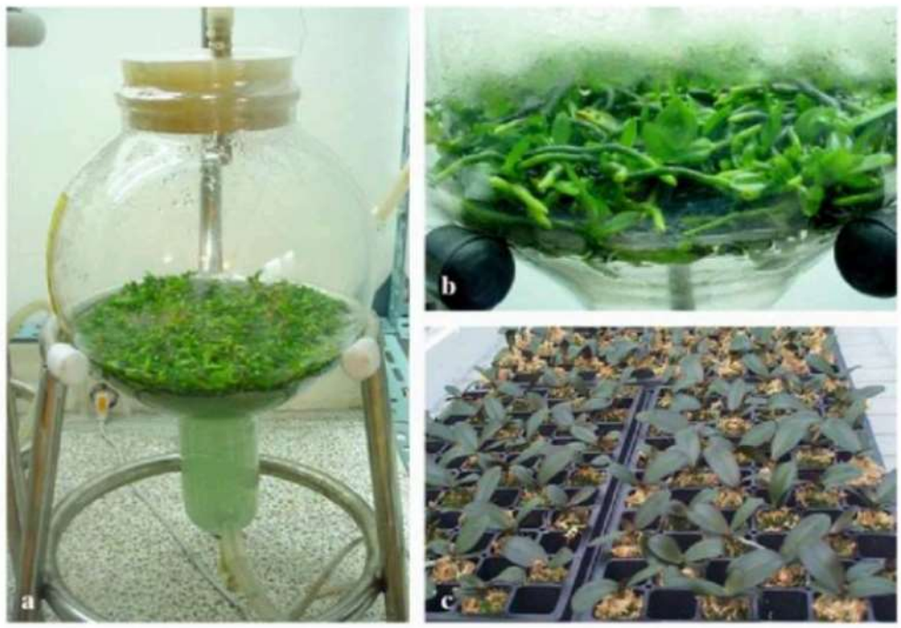
Trước đây, các nồi phản ứng sinh học hay còn gọi là nồi lên men (bioreactor) chủ yếu được dùng cho công nghệ vi sinh. Hệ lên men cũng đã được phát triển để nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật và sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp, sau đó đã được sửa đổi và cải tiến cho quá trình nuôi cấy tạo phôi soma và nuôi cấy rễ tơ ở nhiều loài thực vật… Trên cơ sở các thiết bị đó, với một số cải tiến, nhiều tác giả đã nhân giống thành công nhiều loại phôi vô tính và các thể chồi, cụm chồi hoặc củ nhỏ. Ứng dụng của hệ lên men để nhân giống cây trồng lần đầu tiên được báo cáo bởi Takay-ama và Misawa vào năm 1981 trong trường hợp của cây thu hải đường. Kể từ đó, công nghệ này đã được áp dụng để nhân giống quy mô lớn ở cây hoa loa kèn, dâu tây, khoai tây, cỏ ngọt…

Sự phát sinh phôi soma trong nuôi cấy lắc lỏng hoặc trong hệ lên men cũng đã được báo cáo ở cỏ linh lăng, thối xe, cà phê, cần tây, cây trạng nguyên, cao su và khoai lang. Hiệu quả của việc nhân giống bằng hệ lên men khá cao so với nuôi cấy rắn hoặc lỏng lắc, giúp tiết kiệm thiết bị, dung cụ nuôi cấy và chi phí lao động. Do mẫn cảm với lực trượt của thực vật, đặc biệt là nuôi cấy chồi, hệ lên men có cánh khuấy không phù hợp cho việc nhân giống thực vật ở quy mô lớn. Do đó, hầu hết các hệ lên men được sử dụng thường xuyên cho mục đích này là các hệ lên men bong bóng dạng cột và thông khí.

Môi trường có độ ẩm cao và khí bên trong hệ lên men, bao gồm chủ yếu là nitrogen (78%), oxygen (21%) và CO_2 (0,036%) và một lượng nhỏ ethylene, ethanol, acetaldehyde…. gây ra tình trạng ngậm nước của chồi. Cách được áp dụng để giải quyết vấn đề này là thêm vào các chất ức chế tổng hợp gibberellin để chỉ cho phép lá kéo dài một cách hạn chế, dẫn đến sự nhân lên của các chồi dưới dạng các cụm mô phân sinh hoặc chồi (khối lượng chồi giảm đi rất nhiều). Hệ thống này đã được sử dụng cho chuối, dương xỉ, hoa lay ơn và khoai tây. Vào năm 1994 Akita và cộng sự đã phát triển lò hệ lên men loại cánh quạt thể tích 500 L được lắp một đĩa xốp ở đáy và lưới hình trụ ở giữa để nhân giống cỏ ngọt để tổng hợp stevioside và rebaudioside-A (ngọt hơn 300 - 400 lần so với sucrose). Trong hệ lên men được trang bị bốn đèn huỳnh quang này, tốc độ nhân lên 140 lần trong một tháng đã đạt được. Cụm chồi từ môi trường lắc trên môi trường MS cải tiến được bổ sung với 0,1 mg/L NAA và BAP và sucrose 3%. Hệ lên men chứa 300 L môi trường MS với 1% sucrose được cấy 460 mg mầm chồi và sục khí 15 L/phút, ở 25°C, chiếu sáng 16 h. Sau 3 tuần nuôi cấy, 20 L môi trường được rút ra và 50 L môi trường mới chứa 6.300 g sucrose được bổ sung. Trong vòng một tháng, các chồi nhân lên đầy bình nuôi cấy và tạo ra sinh khối đạt 64,6 kg. Các chồi không có rễ và có thể dễ dàng chuyển ra đất với tỷ lệ sóng sót đến 90%.

Chồi *in vitro* ngâm chìm trong môi trường lỏng thường có hại cho sự phát triển và sức sống của chồi. Do đó, các loại thiết lên men ngập chìm tạm thời, dòng chảy lên xuống, hệ thống bình đôi, phun sương dinh dưỡng, bằng túi nhựa, và hệ thống Rocker đã được thử nghiệm để sản xuất củ khoai tây siêu nhỏ.

Phôi vô tính cà phê được sản xuất thành công ở Brasil trên các nồi phản ứng sinh học dung tích từ 2 - 4 L. Nồi vận hành theo các nguyên tắc của một nồi lên men (có thể không dùng cánh khuấy mà chỉ dùng bọt khí để thực hiện việc truyền khí và truyền nhiệt). Mỗi mẻ có thể thu được 4 - 5 triệu phôi vô tính cà phê. Ở Indonesia, cụm chồi dứa được đưa vào sản xuất thành công với nồi lên men 10 lít. Điểm đáng chú ý trong công nghệ này là thay vì bơm khí vào nồi phản ứng, dịch lỏng nuôi cấy (môi trường mới) được bơm vào nồi và hút ra (môi trường cũ) theo chu kỳ ngắn, nhờ vậy mô và tế bào thực vật có đủ oxy và chất dinh dưỡng để phát triển mạnh. Phương thức nuôi cấy này được gọi là nuôi cấy thể ổn định hóa tính.



Hình 4.12. Nhân giống lan Phalaenopsis từ protocorm bằng hệ thống bioreactor (Paek và cộng sự, 2005)

Chú thích: a, nhân protocorm trong bioreactor; b, tái sinh chồi từ protocorm; c, huấn luyện cây con

Củ siêu bi (microtuber) được thị trường quốc tế công nhận là dạng khoai tây giống của thế kỷ 21. Củ khoai tây siêu bi có kích thước bằng hoặc nhỏ hơn hạt ngô, hoàn toàn sạch bệnh virus được công ty Microtuber Inc. (Mỹ) sản xuất trong các nồi phản ứng là các đoạn thân khoai tây nhân giống bằng cấy mô theo phương pháp cổ điển. Trong nồi phản ứng, các đoạn thân được kích thích ra rễ và tạo củ nhỏ. Hiện nay, Microtuber Inc. có thị trường ở Bắc Mỹ và Hà Lan. Nồi phản ứng ở hãng Microtuber Inc. là các ống nhựa kín chịu nhiệt, đường kính 15 cm, dài 50 cm, quá trình tạo củ hoàn toàn không cần chiếu sáng.

Một vấn đề lớn gặp phải khi nuôi cấy lỏng quy mô lớn trong hệ lên men là sự nhiễm bẩn bởi các vi sinh vật được đưa vào cùng nguyên liệu thực vật và trong quá trình vận hành, có thể gây ra một số tổn thất trong nuôi cấy.

CÂU HỎI ÔN TẬP

Câu 1: Trình bày mục đích của nhân giống vô tính *in vitro* ở thực vật ? Cho các ví dụ minh họa.

Câu 2: Phân tích các ưu điểm và hạn chế của công nghệ nhân giống vô tính *in vitro* ở thực vật ?

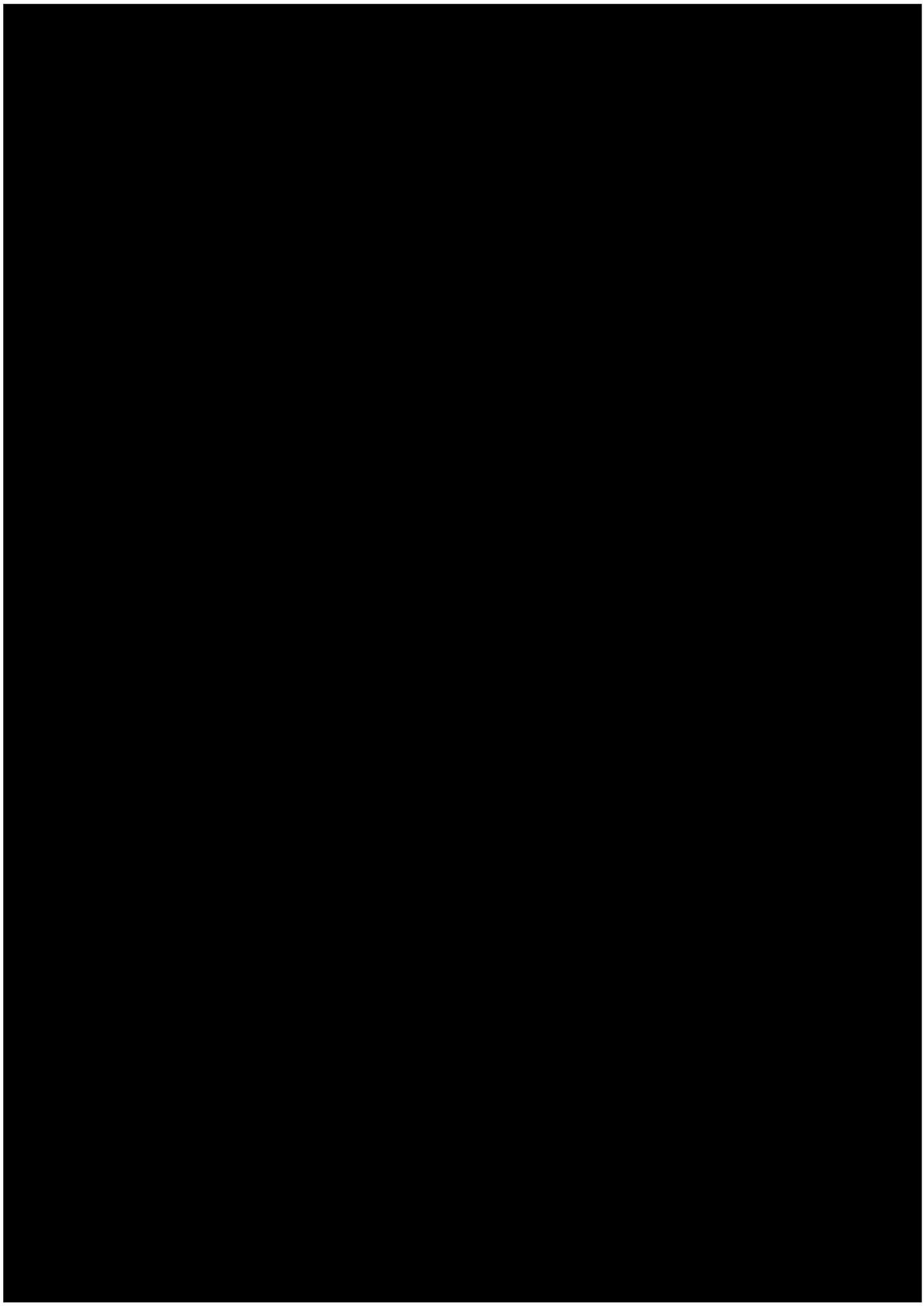
Câu 3: Trình bày con đường nhân giống vô tính *in vitro* thực vật thông qua nuôi cấy tạo phôi soma và công nghệ hạt nhân tạo ? Cho các ví dụ minh họa.

Câu 4: Trình bày con đường nhân giống vô tính *in vitro* thực vật thông qua nuôi cấy tái sinh các cấu trúc sinh dưỡng? Cho các ví dụ minh họa.

Câu 5: Trình bày con đường nhân giống *in vitro* thực vật thông qua nuôi cấy callus ?

Câu 6: Trình bày các giai đoạn chính trong quy trình nhân giống vô tính *in vitro* ở thực vật ?

Câu 7: Trình bày vai trò và ưu điểm của sản xuất cây giống thực vật thông qua nuôi cấy trong hệ phản ứng (bioreactor) ?



thực hiện được trên qui mô công nghiệp. Đến khoảng năm 1987, đã có 30 hệ thống nuôi cấy tế bào thực vật mà khả năng sản xuất các hợp chất thứ cấp cao hơn trong các thực vật tương ứng.

Đến nay, nuôi cấy tế bào thực vật đã bước vào kỷ nguyên của các cây trồng chủ lực (lúa gạo, ngô, *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* và các cây trồng khác). Nhiều hợp chất đã được sản xuất thương mại bằng con đường nuôi cấy tế bào thực vật, bao gồm berberine (*Coptis japonica)*, paclitaxel (*Taxus spp.*), saponin (*Panax ginseng*) và các polysaccharide (*Polianthes tuberosa*) (Kieran, 2001). Hơn nữa, trong sản xuất các chất chuyển hóa, nuôi cấy tế bào thực vật cũng đang được sử dụng để tổng hợp các protein tái tổ hợp trên qui mô lớn.

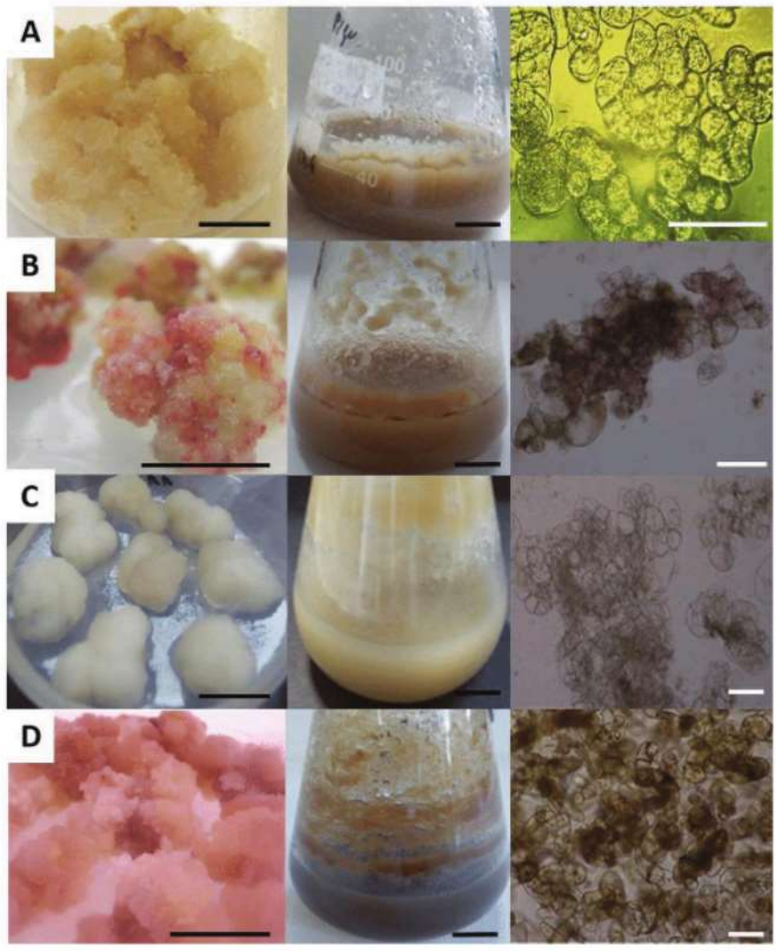
5.1.2. Nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật

5.1.2.1. Nuôi cấy callus

Nuôi cấy tế bào thực vật được khởi đầu bằng việc hình thành các tế bào callus. Nuôi cấy callus đạt được bằng cách nuôi cấy các mẫu mô tách từ thực vật trên môi trường dinh dưỡng cơ bản có chất làm rắn là agar. Môi trường dinh dưỡng cơ bản này chứa các chất dinh dưỡng khoáng đa lượng (nitrogen, kali, phospho,…); vi lượng (cobalt, đồng, sắt,…); nguồn carbon (thường là sucrose) và nhiều loại chất điều hoà sinh trưởng thực vật. Đánh giá chính xác các ảnh hưởng của thành phần môi trường hoặc chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng sinh trưởng của callus là yêu cầu quan trọng để xác định môi trường tối ưu cho nuôi cấy.

Sự không đồng nhất về tế bào của callus do nguồn gốc mẫu nuôi cấy và/hoặc gây ra bởi các điều kiện nuôi cấy. Các callus từ cùng một mẫu cấy có sự khác biệt đáng kể về màu sắc, cấu trúc, hàm lượng nước, tiềm năng tổng hợp hóa học và hình thái. Callus tạo ra có thể kết khối chặt hoặc rời rạc (dễ vỡ vụn), khô hoặc mọng nước, có màu sáng hoặc tối. Những đặc điểm này cũng có thể thay đổi theo thời gian trong nuôi cấy do thay đổi di truyền hoặc do thay đổi môi trường nuôi cấy.

Thường có thể hình thành các loại callus khác nhau từ cùng một nguồn mẫu cấy. Các callus có thể được nhân lên trong khoảng thời gian không giới hạn thông qua các lần cấy chuyền định kỳ trên môi trường mới hoặc được tạo ra để phát triển các cấu trúc có tổ chức (rễ, chồi, phôi).



Hình 5.1. Các dòng callus khác nhau của cây *Chaenomeles japonica* được sử dụng nuôi cấy tế bào tích luỹ pentacyclic triterpenoids and polyphenols (Kikowska và cộng sự, 2019)

Chú thích: A - D, các dòng tế bào được cảm ứng với các điều kiện nuôi cấy khác nhau.

Các tế bào của callus có thể trải qua biến dị dòng soma trong quá trình cấy chuyển. Vì vậy, các dòng tế bào ổn định di truyền nên được lựa chọn để tránh sự sản xuất thất thường các chất trao đổi thứ cấp trong nuôi cấy. Thông thường, sau một số lần cấy chuyển, callus có thể được xem là dòng tế bào đồng nhất khi các thông số sinh trưởng của dòng tế bào được lặp lại trong quá trình cấy chuyển trên cùng một loại môi trường nuôi cấy. Ví dụ, callus cây *T. cuspidate* đã được cảm ứng và thu được dòng tế bào ổn định sinh trưởng sau 2 năm cấy chuyển. Có 217 dòng callus khác nhau từ các loài của chi *Psoralea* đã được cảm ứng. Sau 16 chu kỳ cấy chuyển (48 tuần), có khoảng 90% số dòng callus sinh trưởng ổn định.

Sau khi đạt được sự ổn định di truyền, các khảo sát về hóa học nên được thực hiện nhằm chọn ra dòng tế bào tốt nhất trong sản xuất các chất chuyển hóa để thiết lập nuôi cấy huyền phù tế bào. Các thông số phổ biến nhất dùng trong đánh giá sinh trưởng trong nuôi cấy callus bao gồm khối lượng tươi, khối lượng khô và chỉ số sinh trưởng.

Callus nuôi cấy có thể trở nên rời rạc hơn sau nhiều lần lần cấy chuyển lặp đi lặp lại. Loại callus dễ vỡ vụn thường được dùng làm nguyên liệu để nuôi cấy huyền phù tế bào trong môi trường lỏng. Khả năng rời rạc của khối callus cũng có thể được tạo ra bằng cách thay đổi thành phần chất điều hoà sinh trưởng của môi trường. Nuôi cấy callus có các ứng dụng như sau:

- Đóng vai trò là nguyên liệu ban đầu để bắt đầu nuôi cấy tế bào đơn và nuôi cấy huyền phù tế bào;

- Tạo nguyên liệu sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp;

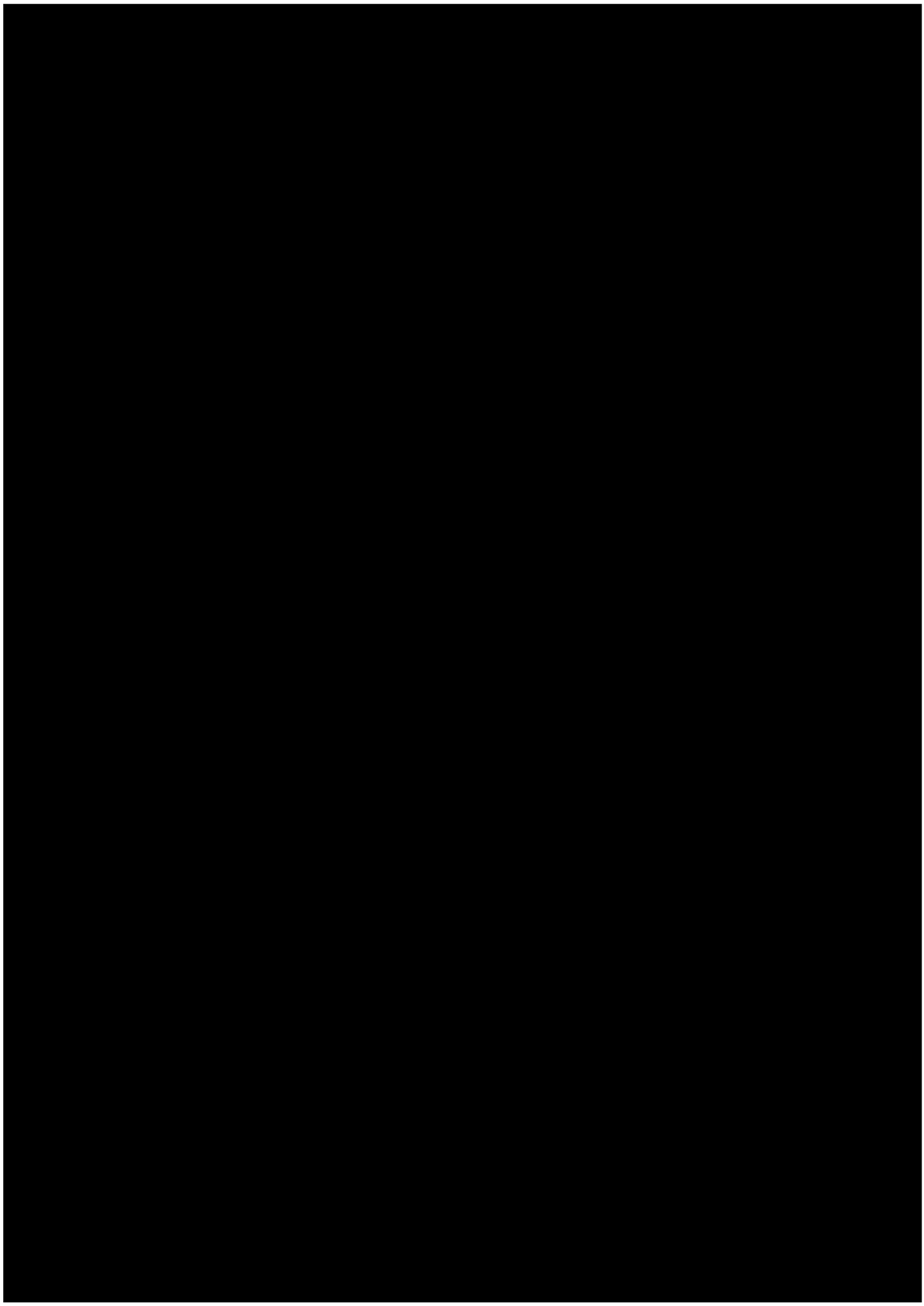
- Cung cấp hệ thống nghiên cứu về hình thái và sinh lý tế bào;

- Tạo ra các biến dị dòng soma hữu ích.

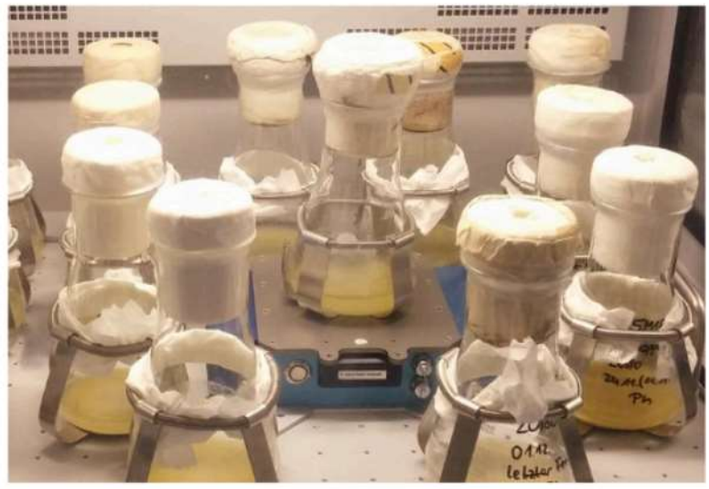
5.1.2.2. Nuôi cấy huyền phù tế bào

Nuôi cấy huyền phù tế bào thường được khởi đầu bằng cách chuyển các khối callus vào nuôi cấy trong môi trường lỏng được khuấy bởi máy lắc, quay hoặc lọc xoay. Mô callus nuôi cấy nên là loại mô dễ vỡ vụn (rời rạc) để có thể thiết lập được dịch tế bào huyền phù với mức độ phân tán cao nhất. Nuôi cấy tế bào huyền phù trong môi trường lỏng cung cấp một hệ thống duy nhất cho những nghiên cứu chi tiết về sinh trưởng và sản xuất các chất chuyển hóa. So với nuôi cấy callus, nuôi cấy huyền phù sản xuất ra lượng lớn sinh khối tế bào mà từ đó các chất chuyển hóa thứ cấp có thể dễ dàng chiết tách. Nuôi cấy dịch huyền phù là sự tiến triển từ thực vật đến mẫu vật, đến callus và cuối cùng đến dịch huyền phù.

Trong quá trình nuôi cấy, các tế bào sẽ dần dần tách ra khỏi khối callus do những chuyển động xoáy của môi trường. Sau một thời gian ngắn nuôi cấy, trong dịch huyền phù là hỗn hợp các tế bào đơn, các khối tế bào với kích thước khác nhau và các tế bào chết. Tuy nhiên, cũng có những dịch huyền phù tốt, chứa tỷ lệ cao các tế bào đơn và tỷ lệ nhỏ các cụm tế bào. Khả năng tách rời của các tế bào trong môi trường có thể cải



nuôi cấy trong các bình tam giác (**Hình 5.2**), sau đó đưa vào nuôi cấy trong hệ lên men nhỏ, rồi cấy chuyển vào hệ lên men lớn hơn. Cứ tiếp tục như vậy cho đến khi đạt được thể tích thích hợp.



Hình 5.2. Nuôi cấy tế *Salvia fruticosa* trong bình tam giác trên máy lắc (Scherhag và cộng sự, 2017)

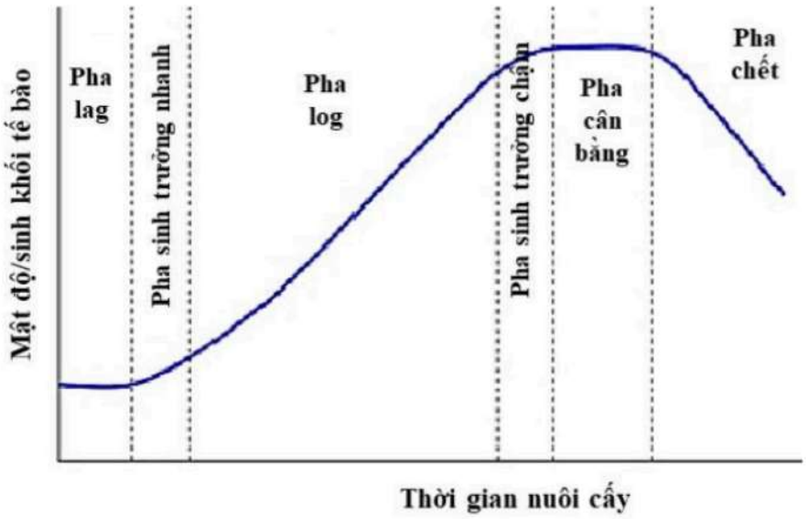
Mặc dù tế bào thực vật và tế bào vi sinh vật có một số điểm khác nhau như kích thước của tế bào thực vật lớn hơn, chu kỳ sinh trưởng của tế bào thực vật dài hơn, sự trao đổi chất chậm hơn… nhưng nhìn chung sinh trưởng của tế bào thực vật trong nuôi cấy mẻ cũng trải qua các pha như tế bào vi sinh vật, gồm có:

- *Pha lag*: Bắt đầu từ khi callus được đưa vào môi trường cho đến khi có dấu hiệu phân chia tế bào đầu tiên. Trong pha này không xảy ra sự tăng về khối lượng và số lượng tế bào. Pha lag được xem là giai đoạn thích ứng với môi trường nuôi cấy trước khi sinh trưởng của tế bào có thể bắt đầu. Độ dài của pha này tuỳ thuộc vào nhiều nhân tố như tuổi của mẫu, nồng độ mẫu và các kiện kiện nuôi cấy. Nếu tế bào được chuyển từ môi trường có nồng độ chất dinh dưỡng thấp sang môi trường có nồng độ chất dinh dưỡng cao, thì pha lag thường kéo dài hơn so với trường hợp ngược lại. Nếu mật độ tế bào càng thấp thì pha lag càng kéo dài. Mật độ tế bào thích hợp cho nuôi cấy tế bào huyền phù khoảng từ 0,5 - 2,5 x 105 tế bào/mL.

- *Pha log:* Ở pha này sự phân chia và tăng khối lượng tế bào diễn ra với tốc độ lớn nhất (số lượng tế bào tăng theo hàm mũ).

- *Pha cân bằng:* Ở pha này hoạt tính phân bào giảm mạnh, số lượng và khối lượng tế bào ổn định.

- *Pha chết:* Sự sinh trưởng của tế bào ra khỏi đỉnh cao, giảm xuống và dần đến ngừng sinh trưởng nếu không được cấy chuyền.

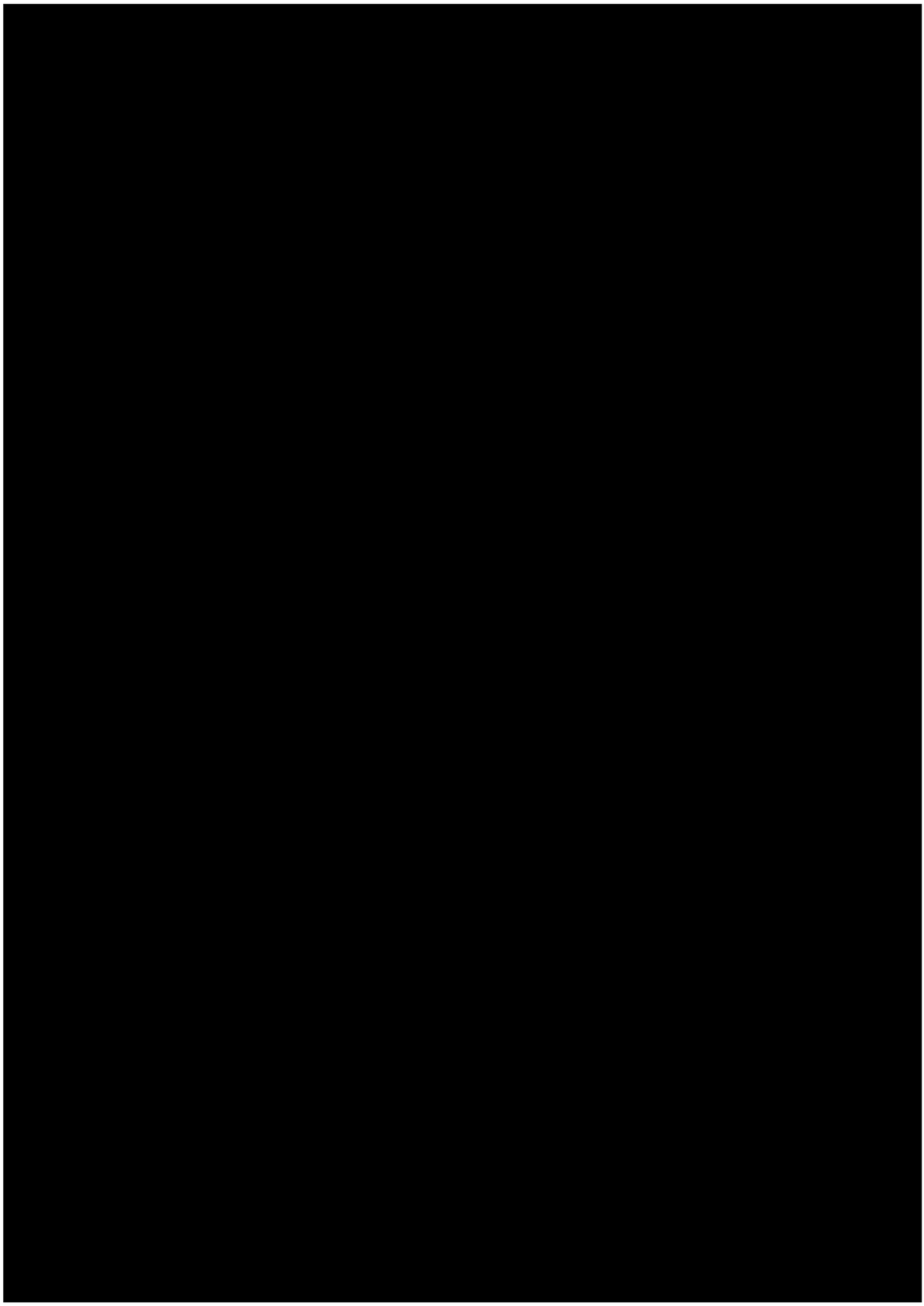


Hình 5.3. Đường cong sinh trưởng của tế bào thực vật trong nuôi cấy mẻ

Do sức sống của các tế bào trong pha ổn định là không giống nhau khi dùng những nguyên liệu khác nhau cho nuôi cấy huyền phù, cho nên thường cấy truyền vào giai đoạn đầu của pha ổn định và thời điểm cụ thể là dựa vào kinh nghiệm, nhưng nói chung cấy truyền nên bắt đầu khi mật độ tế bào là cực đại. Đối với nhiều thí nghiệm nuôi cấy huyền phù, mật độ tế bào cực đại đạt được trong khoảng 18 - 25 ngày, tuy nhiên những huyền phù sinh trưởng mạnh thì thời gian này có thể ngắn hơn từ 6 - 9 ngày. Ở lần cấy truyền đầu tiên, dịch nuôi cấy cần được lọc nhằm loại bỏ các cụm tế bào lớn, các mảnh từ mẫu cấy ban đầu, sau đó dùng pipet để lấy dịch cần truyền. Lượng tế bào đem cấy truyền phải đủ lớn để đảm bảo mật độ tế bào, vì khi thấp quá, các tế bào sẽ không sinh trưởng được.

b. Nuôi cấy mẻ có bổ sung chất dinh dưỡng (nuôi cấy bán liên tục)

Đây là một hình thức khác của phương thức nuôi cấy mẻ. Sau khi tế bào nuôi cấy sinh trưởng cực đại, các chất dinh dưỡng sẽ dần cạn kiệt, lúc này người ta sẽ cung cấp thêm các chất dinh dưỡng mới vào hệ lên men mà không loại bỏ dịch nuôi cũ. Trong hệ



nếu sản xuất ngoại bào các chất chuyển hóa, không cần đến sự phá vỡ tế bào để chiết tách các chất vì chúng có thể thu hồi trực tiếp từ môi trường. Với các đặc tính này, thiết lập hệ thống nuôi cấy liên tục sẽ cải thiện khả năng sản xuất hơn so với nuôi cấy mẻ .

Sau một thời gian ngắn nuôi cấy, dịch huyền phù là một hỗn hợp của các tế bào đơn, các cụm tế bào với kích thước khác nhau, các mảnh còn lại của mẫu cấy và các tế bào chết. Tuy nhiên cũng có những dịch huyền phù hoàn hảo có chứa tỷ lệ cao các tế bào đơn và tỷ lệ nhỏ các cụm tế bào. Mức độ tách rời các tế bào trong môi trường nuôi cấy phụ thuộc vào đặc tính của các khối tế bào, được hình thành từ phân bào và có thể được điều chỉnh bởi sự thay đổi thành phần của môi trường. Khi tăng tỷ lệ auxin/cytokinin thì trong một số trường hợp sẽ sản sinh nhiều khối tế bào dễ vỡ vụn.

Không có một quy trình chuẩn nào cho nuôi cấy huyền phù tế bào, vì vậy chọn lựa điều kiện và môi trường nuôi cấy thích hợp là những nghiên cứu đầu tiên trong nuôi cấy huyền phù tế bào. Nuôi cấy huyền phù khởi đầu cần một lượng mô callus khá lớn, xấp xỉ 2 - 3 g/100 ml dung dịch môi trường. Ví dụ, trong nuôi cấy huyền phù tế bào cà rốt (*Daucus carota* L.), mỗi bình nuôi cấy với 25 ml môi trường cần 0,5 - 0,7 g callus; trong nuôi cấy các tế bào cây sung dâu, mật độ tế bào thích hợp là từ 9 - 15.10^3 tế bào/mL. Những tế bào trải qua quá trình nuôi cấy, sinh trưởng và trao đổi chất trong dịch huyền phù gọi là dòng tế bào.

5.1.2.4. Môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy tế bào

a. Môi trường dinh dưỡng

Môi trường nuôi cấy tế bào thực vật bao gồm các chất kích thích sinh trưởng, các hợp chất vô cơ và hữu cơ. Thành phần môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh trưởng và phát triển của tế bào. Trong giai đoạn đầu của quá trình nuôi cấy, các chất dinh dưỡng giảm nhanh, sản phẩm trao đổi chất mới bắt đầu được tích tụ và tăng dần. Ba hợp phần của môi trường có ảnh hưởng lớn đến quá trình nuôi cấy tế bào thực vật là carbon, nitrogen và phospho. Tuy nhiên, cũng không thể coi nhẹ các hợp phần khác của môi trường nuôi cấy, đặc biệt là các nguyên tố vi lượng và các chất kích thích sinh trưởng. Chúng đóng vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất mặc dù nồng độ của chúng có trong môi trường ở mức độ rất thấp.

Các chất điều hoà sinh trưởng có ảnh hưởng lớn đến tốc độ sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp của mô thực vật trong nuôi cấy *in vitro* cũng như trong cây. Mô của cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*) khi nuôi cấy trên môi trường chứa 2,4-D thì có sản xuất solasodine nhưng khi nuôi cấy trên môi trường chứa IAA hoặc IBA thì lại không. Khi nghiên cứu sản xuất berberine từ tế bào huyền phù *Thalictrum minus*, việc sản xuất berberine tăng lên khi thêm BAP vào môi trường nuôi cấy hơn là sử dụng 2,4-D và NAA. Khi có mặt BAP, tiền chất L-tyrosine nhanh chóng được chuyển thành berberine và sau đó được giải phóng ra môi trường. Ngược lại, các chất chuyển hóa trung gian như tyramine và dopamine lại tích lũy trong các tế bào không sản xuất berberine sinh trưởng trên môi trường bổ sung 2,4-D mà không có mặt BAP. Khi sử dụng phối hợp BAP với NAA, lượng jaceosidin tạo thành tăng tỷ lệ thuận với nồng độ NAA trong tế bào cây hoa sen tuyết (*Saussurea medusa*). Để sản xuất jaceosidin, NAA có hiệu quả hơn và 2,4-D có xu hướng hạn chế sự hình thành hợp chất này.

Mô và tế bào thực vật nuôi cấy *in vitro* sống chủ yếu theo phương thức dị dưỡng, mặc dù ở nhiều trường hợp, chúng có thể sống bán dị dưỡng nhờ điều kiện ánh sáng nhân tạo vì lục lạp vẫn có khả năng quang hợp, nhưng như thế là không đủ. Vì vậy, việc đưa vào môi trường nuôi cấy nguồn carbon hữu cơ là điều bắt buộc. Nguồn carbon thông dụng nhất là sucrose, nồng độ thích hợp 2 - 3%, song cũng còn phụ thuộc vào mục đích nuôi cấy mà thay đổi nồng độ như trong nghiên cứu tạo dòng là 0,2% và 12% khi nghiên cứu cảm ứng stress nước. Nguồn carbon trong môi trường nuôi cấy tế bào thực vật thường được cung cấp dưới dạng carbohydrate, với những loại đường phổ biến như sucrose và glucose. Chất nền carbon vừa tham gia tổng hợp các thành phần của tế bào vừa cung cấp năng lượng đòi hỏi cho quá trình sinh trưởng và tồn tại của tế bào. Nó cũng cung cấp carbon cần thiết cho sự hình thành sản phẩm thông qua trao đổi trung gian. Trong phần lớn các môi trường, nguồn carbon chủ yếu là đường sucrose và glucose với hàm lượng từ 20-40 g/L.

b. Các điều kiện nuôi cấy

Để điều chỉnh sự phát sinh hình thái và tăng trưởng sinh khối của tế bào thực vật trong hệ lên men, nhiều điều kiện nuôi cấy phải được kiểm soát, chẳng hạn như hình thái tế bào, cung cấp oxy, khuấy trộn, pH, nhiệt độ…

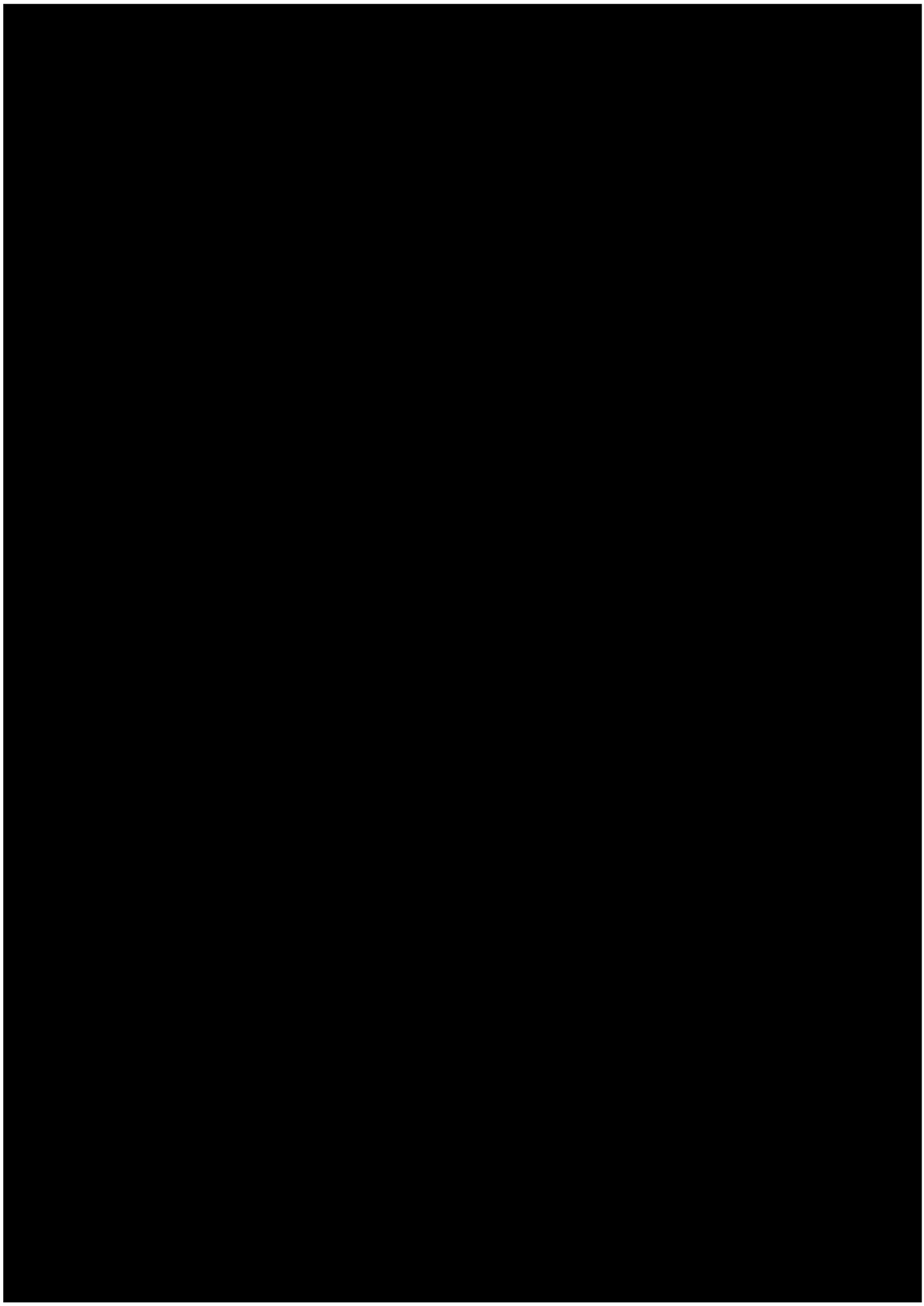
- *Cỡ mẫu nuôi cấy:*

Lượng mẫu đưa vào rất quan trọng khi cấy chuyển tế bào thực vật, và cũng có thể ảnh hưởng đến sự sản xuất hợp chất trao đổi. Khi lượng mẫu ban đầu thấp hơn lượng mẫu tới hạn thấp nhất thì tế bào thường không sinh trưởng được. Ví dụ, hiệu suất tích luỹ rosmarinic acid trong nuôi cấy *A. officinalis* tăng khi lượng mẫu đưa vào lên đến 4 g tế bào khô/L trong khi nồng độ tế bào tối đa không bị ảnh hưởng bởi lượng mẫu đưa vào từ 1 đến 11 g tế bào khô/L. Khi nuôi cấy mẻ tế bào cây *Coptis japonica*, lượng mẫu đưa vào cao thì sinh khối tế bào và berberine thu được cũng cao. Ở mật độ tế bào đưa vào đạt 8 g/L thì mật độ tế bào sau nuôi cấy là 55 g/L và lượng berberine đạt 3,5 g/L.

- *Khuấy trộn, sục khí*

Một thông số quan trọng khác trong nuôi cấy hệ lên men là tốc độ khuấy. Khuấy trộn là điều cần thiết để phân bố đồng đều tế bào, mô, chất dinh dưỡng trong pha lỏng. Việc khuấy trộn thường được thực hiện bằng cách sục khí hoặc dùng cánh khuấy cơ học hoặc kết hợp cả 2 phương pháp trên. Thủy lực cho việc hòa trộn cần phải nhỏ để không làm hư hại mô hay tế bào nhưng phải đủ để kích thích chức năng của tế bào. Các vấn đề chính của sự khuấy trộn trong hệ lên men là sự phân tán của các bong bóng khí, tạo huyền phù các tế bào và tăng cường sự chuyển nhiệt và chuyển khối trong môi trường. Nói chung, hầu hết các chất dinh dưỡng đều có khả năng hòa tan cao trong nước, do đó trong thời gian lên men nếu chỉ để phân bố đều môi trường khi các tế bào tiêu thụ chất dinh dưỡng thì sự khuấy trộn không thật cần thiết. Tuy nhiên, ở trường hợp oxygen hòa tan thì người ta lại rất mong muốn có một sự khuấy trộn tốt vì khả năng hòa tan của nó trong môi trường lên men là rất kém, trong khi yêu cầu oxygen cho sự sinh trưởng của các vi sinh vật hiếu khí (hoặc tế bào thực vật và động vật) lại rất cao.

Sục khí trong nuôi cấy tế bào thực vật đáp ứng ba chức năng chính đó là: duy trì điều kiện hiếu khí, giảm hấp thụ các sản phẩm bay hơi và loại bỏ nhiệt sinh ra từ quá trình trao đổi chất. Tốc độ tiêu thụ oxy đặc trưng (hô hấp) của tế bào thực vật phụ thuộc vào dòng tế bào, điều kiện nuôi cấy và giai đoạn sinh trưởng, nhưng nhìn chung là khoảng 6 x 10^{-4}g O_2/g khối lượng khô/phút. Tốc độ hấp thụ O_2 phải đủ cao để cung cấp đủ lượng oxy cho nhu cầu hô hấp của tế bào và vì thế nó hỗ trợ cho sinh trưởng tế bào và sản xuất các hợp chất mong muốn, nhưng không quá cao bởi vì cả việc cung cấp dư



tế bào và đem xác định thể tích, có thể được tính theo số ml tế bào/ thể tích môi trợờng nuôi cấy hoặc tính theo tỷ lệ %.

5.1.3.3.Xác định khối lượng tươi và khối lượng khô tế bào

Khối lượng tươi được xác định bằng cách thu thập các tế bào trong một thể tích xác định của huyền phù tế bào, sau đó rửa chúng bằng nước cất vô trùng và đem làm khô trong chân không, cuối cùng cân để xác định khối lượng. Để xác định khối lượng khô, cần lấy thể tích huyền phù tế bào nuôi cấy đem ly tâm. Loại bỏ phần nổi, rửa tế bào trên giấy lọc Whatman rồi đem sấy khô trong thời gian 12 giờ ở 80°C cho tới khi khối lượng không đổi và đem xác định.

5.1.4. Nuôi cấy tế bào thực vật trong hệ lên men

Nhìn chung, nâng cấp nuôi cấy tế bào thực vật lên qui mô lớn là thực hiện quá trình sinh học ở qui mô phòng thí nghiệm lặp lại gần như có thể để sản xuất một lượng lớn hơn các sản phẩm mong muốn. Trình tự của một quá trình nâng cấp điển hình bắt đầu từ nuôi cấy tế bào trong các chai, lọ đến bình tam giác nuôi cấy lắc có dung tích 1 L, sau đó đến hệ lên men bằng thuỷ tinh từ 1 - 10 L, và sau đó nâng cấp đến hệ lên men bằng thép không ri từ 30 - 150 L rồi đến 1000 L. Hệ lên men là một hệ thống nuôi cấy tự động mà chức năng chính của nó là cải thiện kiểm soát môi trường để đạt được các điều kiện tối ưu cho sinh trưởng của tế bào và/hoặc hình thành sản phẩm. Tế bào thực vật được nuôi cấy trong hệ lên men đầu tiên vào những năm 1960, sử dụng những thiết bị được làm phù hợp cho nuôi cấy tế bào thực vật từ những thiết bị lên men thương mại hoặc không thương mại dùng trong nuôi cấy tế bào động vật.

Các nghiên cứu trong hệ lên men là khâu cuối cùng của nuôi cấy tế bào huyền phù thực vật để thương mại hóa các chất trao đổi thứ cấp. Đây là bước quan trọng vì có nhiều vấn đề có thể phát sinh khi nâng cấp từ nuôi cấy lắc trong các bình tam giác đến nuôi cấy ở các hệ lên men. Hệ lên men hoạt động như một nhà máy sinh học sản xuất các sản phẩm có chất lượng cao với nhiều ưu điểm như sau:

- Các sản phẩm được kiểm soát không phụ thuộc vào nguồn thực vật sẵn có;

- Tăng các dung tích làm việc;

- Nuôi cấy đồng nhất do có cơ chế khuấy trộn bằng cơ học hoặc sục khí;

- Kiểm soát tốt hơn môi trường nuôi cấy và điều kiện vật lý vì vậy có thể dễ dàng tối ưu hóa các thông số sinh trưởng như: môi trường dinh dưỡng, pH, nhiệt độ,…trong sản xuất các chất chuyển hóa;

- Có thể kiểm soát các sản phẩm cuối cùng dưới các điều kiện sinh trưởng;

- Cải thiện khả năng hấp thụ các chất dinh dưỡng để kích thích tốc độ nhân nhanh và sản xuất hàm lượng cao hơn các hoạt chất sinh học;

- Thu hồi các tế bào đơn giản và nhanh hơn;

- Thuận lợi trong các khảo nghiệm về sinh tổng hợp hoặc/và chuyển hóa sinh học có liên quan với sản xuất các chất trao đổi bởi các enzyme sẵn có;

- Dễ dàng hơn trong phân tách các hợp chất mong muốn bởi tính phức tạp thấp của các dịch chiết;

- Kiểm soát tốt hơn trong nâng cấp sản xuất trên qui mô lớn.

Các hệ lên men được dùng chủ yếu cho nuôi cấy trên qui mô lớn tế bào thực vật để sản xuất sinh khối hoặc các chất chuyển hóa. Hiệu suất của bất kỳ hệ lên men nào đều tùy thuộc một số khả năng sau:

- Duy trì nồng độ sinh khối phải cao;

- Duy trì điều kiện vô trùng;

- Phân bố đồng đều dinh dưỡng và các nguyên liệu sống trong nồi lên men thông qua sự khuấy trộn hiệu quả;

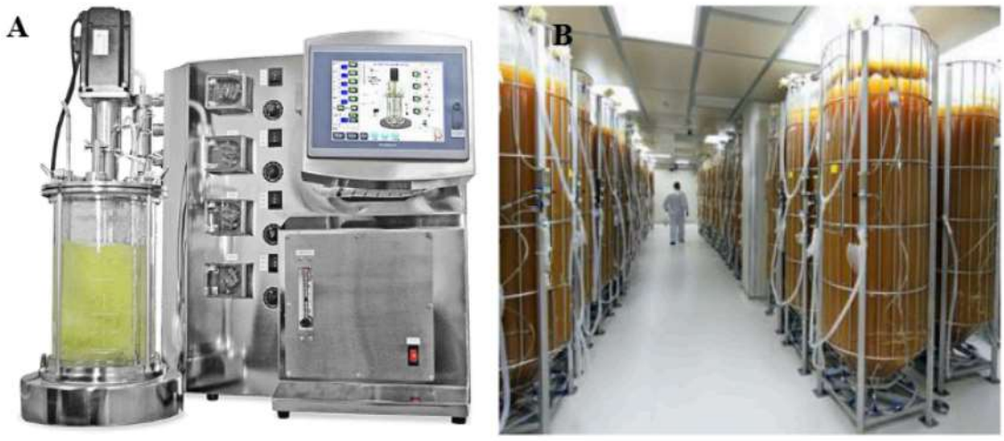
- Tăng hoặc giảm nhiệt tùy vào yêu cầu nuôi cấy;

- Tạo ra lực trượt vừa phải. Mức độ trượt cao có thể nguy hại cho tế bào nuôi cấy, nhưng lực trượt thấp cũng có thể không mong muốn bởi vì hình thành bọt hoặc bám dính của các khối tế bào lên cánh khuấy và thành của nồi lên men.

Có nhiều kiểu của hệ lên men đã được dùng trong nuôi cấy tế bào thực vật. Các hệ lên men có tính truyền thống như các hệ lên men khuấy trộn có cánh khuấy, đẩy khí và dạng cột sủi bọt khí sử dụng trong nuôi cấy in vitro tế bào thực vật đã được phiên bản từ các hệ lên men dùng trong công nghệ sinh học vi sinh vật. Những nỗ lực thiết kế hệ lên men dành riêng cho nuôi cấy tế bào thực vật được thực hiện vào cuối những năm

1970. Với sự nhận thức sâu về tính mẫn cảm của các tế bào thực vật trong nuôi cấy in vitro với lực trượt, vì vậy trong hơn một thập niên, chỉ có dạng nồi lên men đẩy khí lên được xem là thích hợp cho nuôi cấy tế bào thực vật.

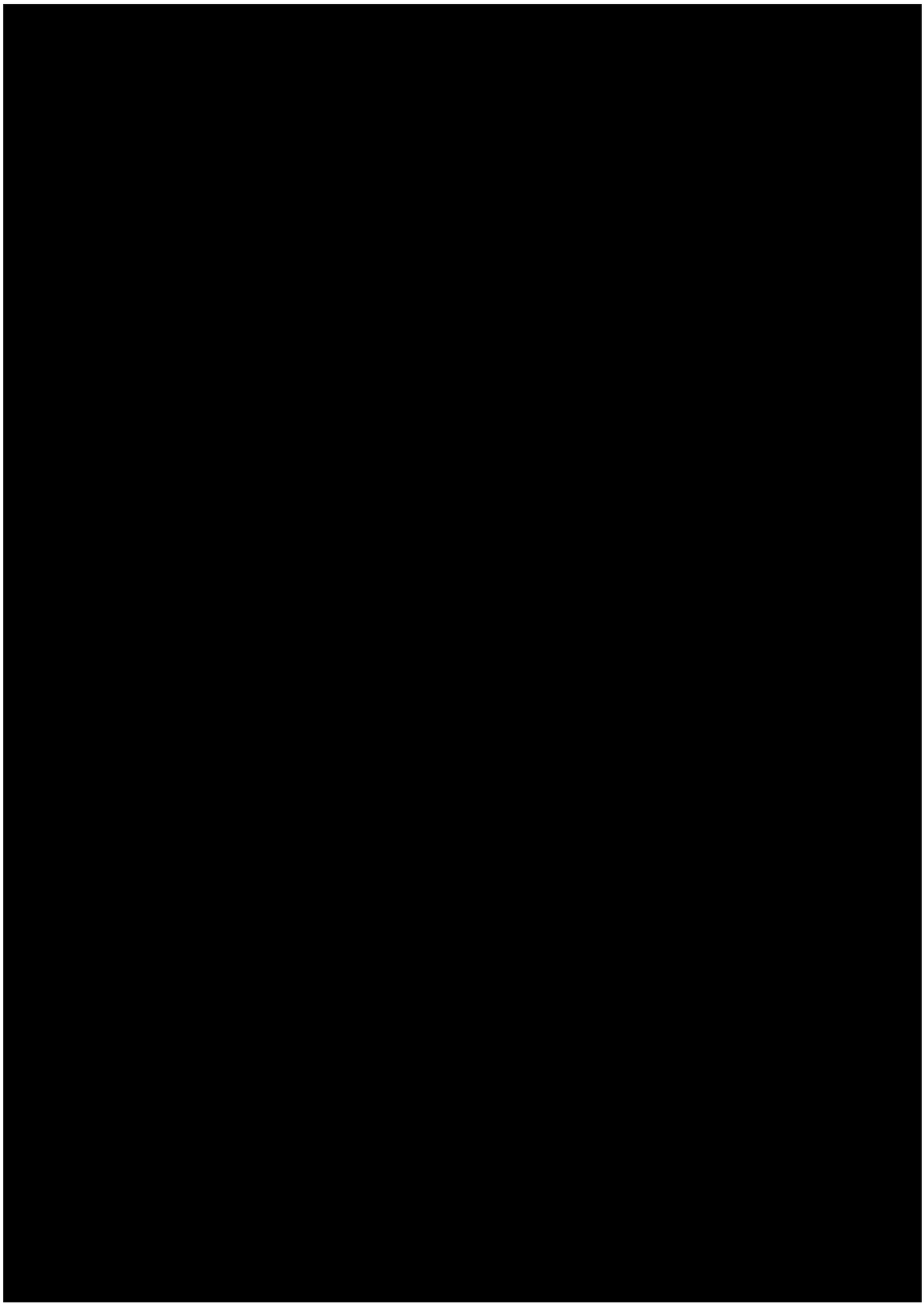
Tuy nhiên, đã có nhiều nghiên cứu trong phòng thí nghiệm tiến hành nuôi cấy tế bào thực vật trong hệ lên men khuấy trộn có cánh khuấy. Ritterhaus và cs (1990) đã sử dụng các hệ lên men khuấy trộn có cánh khuấy với dung tích 75, 750, 7,500, 15,000 và 75,000 L để nuôi cấy tế bào cây *Echinacea purpurea*, *Rauwolfia serpentina* và một số thực vật khác trên qui mô lớn. Một loại hệ lên men mới dùng nuôi cấy *in vitro* thực vật mẫn cảm với lực trượt đó là hệ lên men khuấy trộn với cánh khuấy ly tâm.



Hình 5.4. Nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật trong hệ bioreactor (Tekoah và cộng sự, 2015)

Chú thích: A, Hệ bioreactor quy mô phòng thí nghiệm, B, hệ bioreactor công nghiệp.

Để giảm thiểu những nỗ lực tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy và giá thành sản xuất, gần đây một số kiểu hệ lên men khác dùng cho nuôi cấy tế bào thực vật cũng đã được phát triển. Hệ lên men dạng sóng là hệ lên men chuyển động cơ học mà không khuấy cơ học trực tiếp, thích hợp cho nuôi cấy các dòng tế bào thực vật mẫn cảm với stress lực trượt. Hơn nữa, sự vắng mặt của hiện tượng sinh trưởng bám thành của tế bào cũng như giảm tạo bọt trong nuôi cấy, các thiết bị lên men dạng này được cho là hoàn toàn thích hợp trong nuôi cấy tế bào, mô và các cơ quan của thực vật. Một nhóm nghiên cứu của Trung tâm Nestle R&D ở Tours, Pháp cũng đã công bố hai kiểu hệ lên men khác đó là kiểu sóng/giật lùi và sủi bọt slug. Hệ lên men kiểu sóng/giật lùi có thể tích làm việc từ 10 đến 100 L, với chuyển động sóng kết hợp giật lùi đảm bảo sự khuấy trộn và thông khí mà không tạo bọt trong nuôi cấy. Mặc dù hệ số trao đổi thể tích của hệ lên



Nghiên cứu nuôi cấy tế bào thực vật đã được quan tâm từ những năm 1950. Sau đó, một loạt các thành công trong nghiên cứu về tích lũy các hợp chất thứ cấp trong tế bào nuôi cấy *in vitro* đã được công bố. Những năm gần đây, cùng với những thành tựu đạt được trong lĩnh vực sinh học phân tử và enzyme học, nuôi cấy tế bào thực vật đã trở thành phương thức thay thế hấp dẫn đối với thực vật để sản xuất nhiều hợp chất thứ cấp có giá trị cao.

5.2.1. Hợp chất thứ cấp ở thực vật

Ở thực vật, có nhiều loại hợp chất hữu cơ hoặc các chất chuyển hóa được tạo ra trong quá trình trao đổi chất. Những chất chuyển hóa này được xếp thành nhóm các chất trao đổi sơ cấp và thứ cấp. Các chất trao đổi sơ cấp như chlorophyll, amino acid, nucleotide, các carbohydrate đơn giản hoặc lipid của màng, chúng có vai trò quan trọng trong quá trình quang hợp, hô hấp, vận chuyển các chất hòa tan, quá trình đồng hóa và dị hóa các chất dinh dưỡng. Các hợp chất thứ cấp khác so với các hợp chất sơ cấp ở chỗ chúng chỉ phân bố có giới hạn trong thế giới thực vật. Các hợp chất thứ cấp tìm thấy chỉ trong một số loài thực vật hoặc trong nhóm loài có liên quan nhau, trong khi đó các hợp chất sơ cấp được tìm thấy trong hầu hết các loài. Trong vài thập kỷ qua, những bằng chứng từ thực nghiệm và trong thực tế cho thấy các hợp chất thứ cấp ở thực vật có các chức năng cơ bản sau: Bảo vệ cơ thể chống lại các loài động vật ăn cỏ (côn trùng và động vật có xương sống); Kháng nấm và vi khuẩn; Kháng virus; Bảo vệ cơ thể chống lại sự canh tranh của các thực vật khác về ánh sáng, nước và chất dinh dưỡng; Thu hút các loài động vật trong quá trình thụ phấn và phát tán hạt; Tạo ra các tín hiệu trong giao tiếp giữa thực vật với các loài vi sinh vật cộng sinh; Bảo vệ cơ thể chống lại tia tử ngoại và các tác nhân vật lý bất lợi khác.

Các hợp chất thứ cấp của thực vật thường được tổng hợp từ các sản phẩm của quang hợp, chẳng hạn: alkaloid được tổng từ các amino acid; các hợp chất như steroid, terpenoid và cardiac glycoside được tổng hợp từ acetic acid; các chất kháng sinh và vitamin được tổng hợp từ các carbohydrate. Các chất thứ cấp được dự trữ chủ yếu trong các cấu trúc đặc biệt hoặc các cơ quan dự trữ như rễ, các tế bào dự trữ, không bào, hệ thống màng. Các hợp chất hóa học này được dùng trong dược phẩm, hóa chất nông nghiệp, thuốc nhuộm, gia vị, chất tạo mùi, thuốc trừ sâu; chúng đã đóng góp nhiều tỷ đô la trong sản xuất công nghiệp.

Sự hình thành và tích lũy các hợp chất thứ cấp có thể bị giới hạn trong các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của thực vật; các cơ quan, mô hoặc các tế bào đặc biệt. Ở thực vật có sự tương quan chặt chẽ giữa biểu hiện các hợp chất thứ cấp, hình thái và sự phân hóa của tế bào. Vì vậy, trao đổi thứ cấp được xem là một khía cạnh của quá trình phát triển ở thực vật.

5.2.2. Sản xuất các hợp chất thứ cấp ở thực vật bằng nuôi cấy tế bào thực vật

Đa số các hợp chất trao đổi thứ cấp được sản xuất từ các nguyên liệu thực vật thu hái trong thiên nhiên hay một số loài cây trồng thể hiện một số bất lợi như: tàn phá môi trường và xói mòn di truyền; sự cung cấp nguồn nguyên liệu không liên tục, bền vững và chất lượng nguyên liệu thô không ổn định; các thực vật có thể bị nhiễm bẩn bởi thuốc trừ sâu, vi sinh vật gây bệnh, hợp chất phóng xạ hay kim loại nặng khi chúng được thu hái từ những vùng bị nhiễm bẩn.

Nuôi cấy tế bào và mô thực vật cho phép sản xuất các hợp chất trao đổi thứ cấp được thực hiện trong điều kiện *in vitro*. Quá trình này dễ dàng được chuẩn hóa (không phụ thuộc vào các nhân tố phi sinh học như khí hậu, quang chu kỳ, nhiệt độ, mùa vụ...). Một số lợi thế của sản xuất các hợp chất trao đổi thứ cấp bằng phương pháp nuôi cấy tế bào:

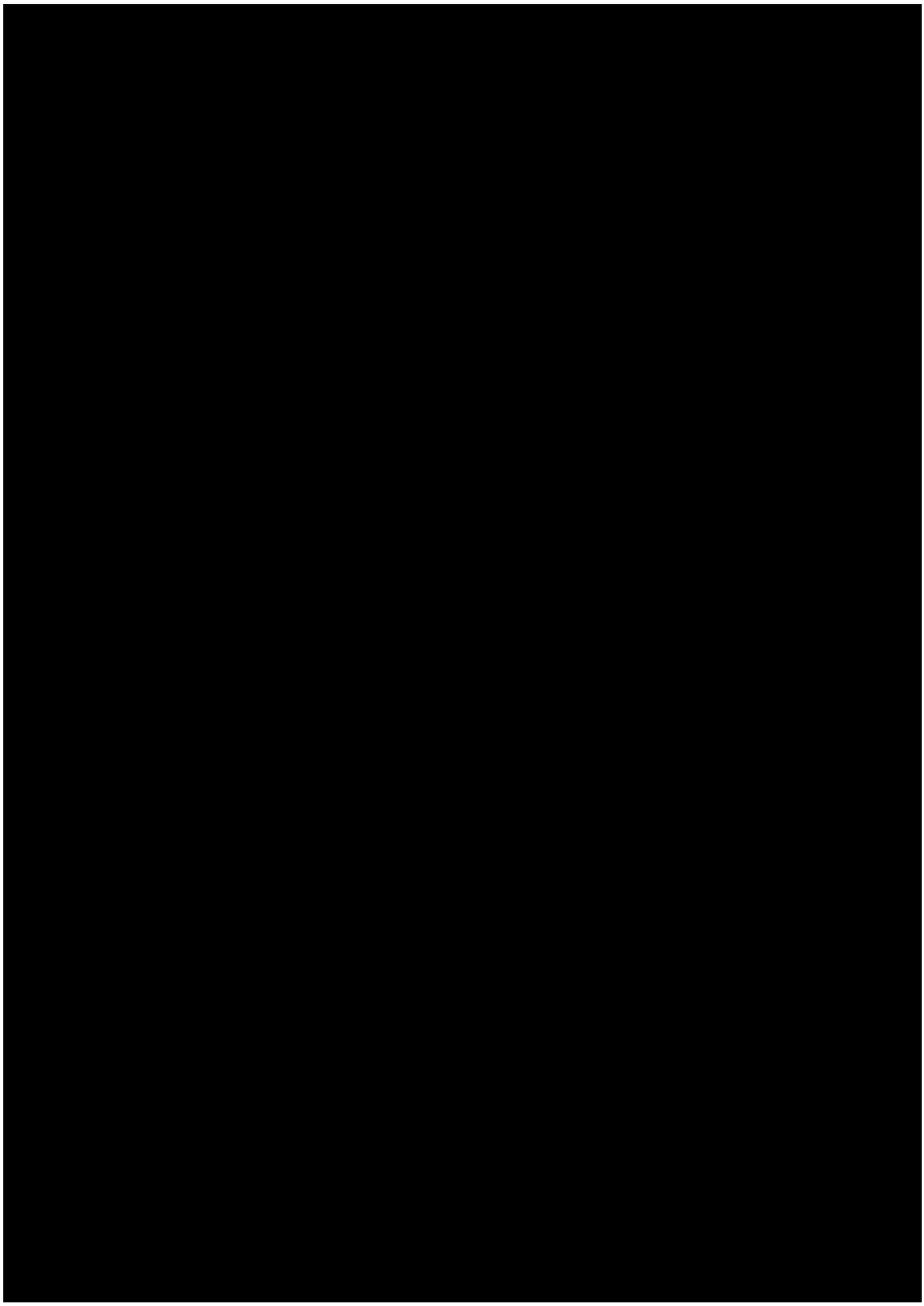
- Sản xuất các hợp chất thứ cấp theo yêu cầu với số lượng thấp hoặc với số lượng rất lớn mà những phương pháp công nghiệp và thương mại không thể sản xuất được;

- Sản xuất nhiều hợp chất khác ngoài những hợp chất yêu cầu chính. Điều đáng lưu ý là điều kiện nuôi cấy biến đổi, các tế bào, mô nuôi cấy có thể biến đổi thế năng sinh tổng hợp nhiều hợp chất bao gồm cả khả năng cảm ứng những hợp chất mới hoặc những hợp chất chưa biết;

- Biến đổi những hợp chất trao đổi thứ cấp và những dẫn xuất của chúng trong quá trình sinh trưởng của tế bào thực vật. Điều đó dẫn tới sự chuyển đổi trong hoạt tính sinh học của các hợp chất.

5.2.2.1. Các chất thứ cấp dùng trong y dược

a. Các alkaloid



nghiên cứu. Người ta nhận thấy, mặc dù các tế bào *Digitalis* ngừng sản xuất glycoside tim nhưng chúng vẫn có khả năng hydroxyd hóa digitoxin ở nguyên tử C 12 để tạo ra digoxin. Digoxin là một hợp chất có ý nghĩa y học lớn hơn digitoxin. Quá trình hydroxyd hóa xảy ra trong nuôi cấy tế bào rất nhanh và rất hiệu quả khi đưa vào môi trường nuôi cấy chất β-methyl-digitoxin. Sau 12 ngày, người ta đã thu được 4 g β-methyl-digitoxin trong một bình nuôi dung tích 20 L.

c. Một số chất khác

Công nghệ sản xuất shikonin, một loại sắc tố đỏ có khả năng diệt khuẩn, có trong rễ của cây *Lithospermum erythrorhizon*. Bình thường shikonin tích lũy không nhiều trong rễ. Tuy nhiên, các nhà khoa học Nhật đã tạo được dòng tế bào rễ cây *Lithospermum* có khả năng tích lũy đến 15% shikonin và đã hoàn chỉnh công nghệ nuôi cấy tế bào sản xuất shikonin. Công nghệ này cho phép trong một chu kỳ nuôi cấy thu hoạch tới 5 kg hoạt chất và giúp giảm rất nhiều giá thành của shikonin. Hàm lượng tương đối cao của ubiquinone-10 được tìm thấy trong tế bào thuốc lá nuôi cấy *in vitro* và của L-dopa trong môi trường nuôi cấy tế bào *Mucuma pruriens*. Nuôi cấy tế bào của cây *Panax pseudoginseng* đã cho hàm lượng saponin khá cao. Nuôi cấy tế bào của cây *Glycyrrhiza glabra* đã thu được hàm lượng glycyrrhizin từ 3 - 4% trọng lượng khô. Hàm lượng chất thứ cấp cao nhất được tìm thấy trong nuôi cấy tế bào của cây *Coleus blumei* đó là chất rosmarinic axit chiếm 13 - 15% trọng lượng khô trong chu kỳ nuôi 13 ngày, lớn gấp 5 lần so với hàm lượng trong cây trồng ở điều kiện tự nhiên. Trong những năm 1980, người ta cũng đã sản xuất rất có hiệu quả ginsengoside là hoạt chất chủ yếu của nhân sâm *Panax ginseng*. Các anthraquinone là một nhóm các sản phẩm tự nhiên quan trọng có ở vi khuẩn, nấm, địa y và thực vật bậc cao có các hoạt tính sinh học như: kháng khuẩn, kháng nấm, giảm huyết áp, giảm đau, chống sốt rét, chống oxy hóa, kháng bệnh bạch cầu và các chức năng đột biến. Ở thực vật bậc cao, chúng đã được tìm thấy ở rất nhiều họ thực vật khác nhau, chẳng hạn Rubiaceae, Rhamnaceae, Polygonaceae, Leguminosae... Nuôi cấy tế bào các loài của họ Rubiaceae đã cho phép thu được một lượng lớn anthraquinone thậm chí trong một số trường hợp đã vượt quá hàm lượng anthraquinone ở cây bố mẹ.

5.2.2.2. Các chất thứ cấp dùng trong nông nghiệp

Nhìn chung, các chất trao đổi thứ cấp của thực vật sử dụng trong nông nghiệp một cách hạn chế. Có 03 hợp chất nguồn gốc từ thực vật được biết có tác dụng trừ sâu hại là pyrethrine từ cây cúc Chrysantemum cineraifolium, rotenone từ Derris elliptica và nicotin từ cây thuốc lá Nicotinana tabacum. Chúng ta biết rất ít về hiệu quả của nuôi cấy tế bào Ch. cineraifolium trong sản xuất pyrethrine và nuôi cấy rễ cây Derris elliptica để thu rotenone. Nicotine có thể sản xuất bằng nuôi cấy huyền phù tế bào thuốc lá với hiệu suất đạt 2,2%. Tuy nhiên, vì nicotine không được sử dụng rộng rãi làm thuốc trừ sâu nên kỹ thuật này trong thực tế không được áp dụng.

5.2.2.3. Các chất thứ cấp dùng trong thực phẩm

a. Các chất màu

Anthocyanin

Các anthocyanin là các sắc tố tiêu biểu có trong các loài thực vật hạt kín và các loài thực vật có hoa của các họ Poaceae, Fabaceae, Rosaceae, Cruciferae, Vitaceae và Solanaceae tập trung ở các bộ phận khác nhau như rễ, lá, hoa và quả. Anthocyanin tách chiết từ nho là nguồn tiềm tàng nhất trên thế giới. Hiện nay, người ta cũng đã tiến hành nuôi cấy tế bào của các loài *Vitis vinifera*, *Daucus carota* và *Euphorbia millii* để sản xuất anthocyanin. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào là phương tiện lý tưởng để sản xuất anthocyanin với sản lượng cao từ 10 - 20% trọng lượng khô. Sản xuất anthocyanin nói chung đạt cực đại trong suốt pha tĩnh. Stress thẩm thấu được tạo ra do sucrose và các tác nhân khác cho thấy có thể điều hòa quá trình sản xuất anthocyanin trong nuôi cấy tế bào *V. vinifera*.

Betalaine

Các betalaine là các sắc tố tiêu biểu có trong các loài thực vật hạt kín và các loài thực vật có hoa thuộc các họ Chenopodiaceae, Amaranthaceae và Phytolacaceae. Một số loài nấm ăn thuộc bộ Agaricinales cũng sản xuất betalaine. Nuôi cấy tế bào thực vật đã chứng minh được khả năng sản xuất betalaine. Giống như nhiều chất thứ cấp khác, betalaine trong nuôi cấy tế bào thực vật đạt nồng độ cực đại trong pha tĩnh của sinh trưởng tế bào. Tuy nhiên, nuôi cấy tế bào dịch huyền phù của *Phytolacca americana* lại cho thấy betalaine đạt nồng độ cao nhất ở pha sinh trưởng hàm mũ (pha log). Tế bào cây

Chenopodium rubrum nuôi cấy 15 ngày tuổi có thể sản xuất được 35-45 mg betalaine/L môi trường. Nuôi cấy tế bào và nuôi cấy rễ tơ của cây *Beta vulgaris* cũng được tiến hành để sản xuất betalaine.

Crocin và crocetin

Crocus sativus (cây nghệ tây) là nguồn cung cấp crocin chủ yếu, một loại sắc tố màu đỏ tươi được tìm thấy trong đầu nhụy của nó. Đầu nhụy cây nghệ tây (saffron) cũng sản xuất các crocetin. Crocin là một digentiobiocide ester của crocetin. Đây là loại nguyên liệu có giá trị cao, do thực tế cây nghệ tây chỉ có thể sinh trưởng ở những vùng địa lý đặc biệt trên thế giới và đòi hỏi nhiều nhân công khi thu hoạch. Muốn thu hoạch 1 kg đầu nhụy nghệ tây (một loại gia vị có giá trị) cần phải có khoảng 150.000 hoa. Hiện nay, người ta đã phát triển các phương pháp nuôi cấy tế bào của đầu nhụy cây nghệ tây trong điều kiện *in vitro* để sản xuất các gốc cơ bản của saffron. Mô nuôi cấy trong trường hợp này được cảm ứng để sản xuất các callus có màu chứa crocin và các crocetin và cũng là safrana (gốc cơ bản của chất màu) của saffron.

Capsaicin và các capsaicinoid

Capsaicin là gốc cay chủ yếu của ớt, các capsaicinoid chịu trách nhiệm cho vị cay là dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homocapsaicin và homo-dihydrocapsaicin. Capsaicinoid được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm như một phụ gia. Ngoài ra, người ta còn sử dụng capsaicin tinh khiết để bào chế dược phẩm điều trị chứng viêm khớp và làm thuốc giảm đau. Capsaicin có thể được sản xuất bằng nuôi cấy bất động tế bào của *Capsicum frutescens*. Các tế bào *Capsicum* bất động sẽ sản xuất capsaicin cao gấp vài lần so với tế bào dịch huyền phù tự do. Mô giá noãn của *Capsicum* được bất động sẽ sản xuất lượng capsaicin cao hơn các tế bào bất động.

b. Các chất mùi

Vanilla

Đây là nguyên liệu tạo mùi phổ biến và được sử dụng rộng rãi nhất. Vanilla tự nhiên là thị trường rất hứa hẹn cho sản xuất chất mùi bằng phương pháp công nghệ sinh học. Nó là hỗn hợp phức tạp của các thành phần chất mùi chiết ra từ hạt của *Vanilla planifolia*. Đây là hóa chất mùi phổ biến và được sử dụng rộng rãi cho nhiều loại thực phẩm. Khoảng 12.000 tấn vanilla được tiêu thụ hằng năm, nhưng trong đó chỉ khoảng

20 tấn được tách chiết từ hạt, phần còn lại được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học, thường là từ các sản phẩm hóa dầu như guaiacol và một đôi khi từ lignin, một sản phẩm của bột giấy. Sản xuất các hợp chất mùi vanilla bằng phương pháp nuôi cấy tế bào cây *V. planifolia* đã được chứng minh thành công. Nuôi cấy tế bào cây *V. planifolia* được khởi đầu bằng nuôi cấy các cơ quan khác nhau của cây như lá hoặc đoạn thân bằng cách dùng các tổ hợp chất kích thích sinh trợởng khác nhau. Thông thường, kinetin được dùng để khởi động sự tổng hợp vanillic axit trong nuôi cấy dịch huyền phù của *V. planifolia*. Sản xuất vanilla được cải thiện bằng cách bổ sung thêm than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy. Sản lượng vanilla trong nuôi cấy tế bào thường là 2,2%. Một số cải tiến điều kiện nuôi cấy đã làm giảm thời gian nuôi cấy tế bào từ 160 giờ còn 50 giờ và sản lượng vanilla tăng từ 100 mg/L lên đến hơn 1.000 mg/L, tương đương 8% hàm lượng vanilla trên trọng lượng khô.

- Garlic và onion

Các chất mùi garlic và onion cũng được sản xuất trong nuôi cấy tế bào. Các chất mùi này phát triển từ các tiền chất ngoại sinh trong quá trình xử lý sau thu hoạch. Nuôi cấy tế bào cây tỏi (*Allium sativum*) không phân hóa (hoặc các callus phân hóa có màu xanh lục) đã thu được một số loại tiền chất amino axit (methyl, propyl, allyl và cysteine sulphoxides) và hai loại hợp chất ninhydrin-positive không xác định. Chất mùi tổng số thu được trong callus hình cầu màu trắng và callus màu xanh lục phân hóa chậm (tương ứng là 4% và 13% so với cây trồng trong tự nhiên. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật của cây hành (*Allium cepa*) để sản xuất các chất mùi onion cũng đã được phát triển. Prince (1991) đã chứng minh sự tăng lên của các hợp chất mùi onion trong nuôi cấy rễ. Thông qua việc bổ sung các amino axit như cysteine, methionine và glutathione, nồng độ cuối cùng của sản phẩm có thể tăng lên rất lớn.

c. Các chất ngọt

Stevioside

Stevioside tự nhiên ngọt hơn sucrose khoảng 300 lần. Dịch chiết từ cây hoàn chỉnh chứa khoảng 41% stevioside. Các kiểm nghiệm về độc chất học cho thấy rằng stevioside hoàn toàn an toàn cho người dùng. Hơn nữa, các nghiên cứu nha khoa gợi ý rằng các sản phẩm này có thể ức chế thực sự sinh trưởng của các vi sinh vật vùng miệng. Sản

xuất stevioside trong nuôi cấy callus của *Stevia rebaudiana* đã được nghiên cứu chi tiết. Những nuôi cấy chồi tạo rễ đã cho vị ngọt, chứng minh rằng cả hai: rễ và lá cần thiết cho sự tổng hợp stevioside.

5.2.2.4. Các chất dùng trong mỹ phẩm

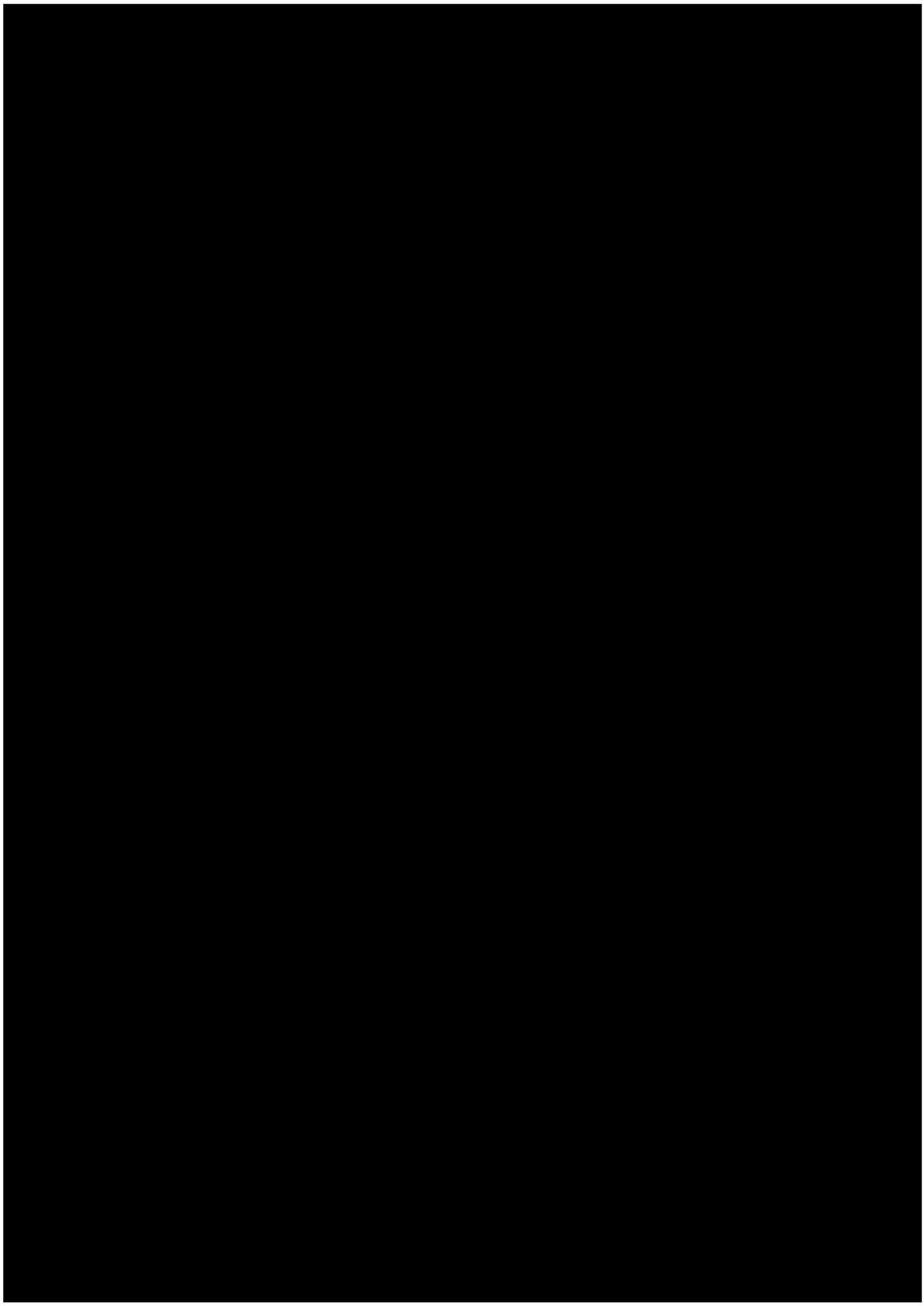
Trong công nghệ mỹ phẩm có 2 loại chất trao đổi thứ cấp của thực vật được quan tâm nhất là chất màu và chất thơm. Vì các hợp chất thơm là các este có cấu trúc phức tạp nên chúng được sản xuất bằng nuôi cấy mô, với số lượng thấp Shikonin là chất mầu đã được sản xuất thương mại bằng nuôi cấy mô. Shikonin là chất chiết từ rễ của các loài thuộc họ Boraginaceae như: *Lithospermum erythrorhizon*. Nó có hoạt tính kháng sinh và đã được dùng trong y học cổ truyền của Nhật Bản từ lâu. Shikonin có màu đỏ huyết dụ do đó được dùng trong công nghệ mỹ phẩm, đặc biệt trong sản xuất son môi ở Nhật. Shikonin được sản xuất công nghiệp bằng nuôi cấy tế bào bằng hệ thống bioreactor với 2 giai đoan nuôi cấy: Trong giai đoạn 1, tế bào thực vật được sinh trưởng trong bioreactor 200 L để tăng trưởng lượng tế bào. Giai đoạn 2: chúng được chuyển sang bioreactor 750 L để sản xuất shikonin. Tính toán về hiệu quả kinh tế cho thấy phương pháp này hiệu quả hơn phương pháp truyền thống 800 lần.

5.2.3. Một số giải pháp nâng cao khả năng sản xuất các hợp chất thứ cấp

Trong nuôi cấy tế bào thực vật để sản xuất các hợp chất thứ cấp, việc lựa chọn cẩn thận các tế bào có khả năng sinh trưởng mạnh và các điều kiện nuôi cấy tối ưu giúp tăng tích lũy các sản phẩm thứ cấp. Tuy nhiên, để đạt hiệu suất cao cho khai thác thương mại, người ta đã sử dụng nhiều phương pháp khác nhau nhằm kích thích quá trình tổng hợp các chất của tế bào nuôi cấy. Sau đây là một số giải pháp để kích thích tế bào nuôi cấy tích lũy sản phẩm cao:

a. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy, các thông số hóa học và vật lý như thành phần và pH môi trường, chất điều hoà sinh trưởng, nhiệt độ nuôi cấy, sự thông khí, sự lắc hoặc khuấy trộn và ánh sáng đã ảnh hưởng đến hàm lượng các hợp chất thứ cấp. Một vài sản phẩm tích lũy trong tế bào ở mức cao so với trong cấy trồng tự nhiên khi được nuôi cấy ở điều kiện tối ưu. Các thông số vật lý và yếu tố dinh dưỡng trong một mẻ nuôi cấy có thể gần như là yếu tố cơ bản cho việc tối ưu hóa hiệu suất.



CÂU HỎI ÔN TẬP

Câu 1: Trình bày các phương thức nuôi cấy tế bào thực vật ?

Câu 2: Phân tích vai trò của môi trường dinh dưỡng và các điều kiện nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật ?

Câu 3: Giải thích nguyên tắc của phương pháp đánh giá sự sinh trưởng của tế bào thực vật nuôi cấy ?

Câu 4: Trình bày những hiểu biết về nuôi cấy tế bào thực vật trong hệ phản ứng ?

Câu 5: Trình bày những hiểu biết về hợp chất trao đổi thứ cấp ở thực vật ? Hợp chất thứ cấp thực vật được sản xuất bằng nuôi cấy tế bào được sử dụng trong các lĩnh vực nào ?

Câu 6: Trình bày các giải pháp nâng cao khả năng sản xuất các hợp chất thứ cấp bằng con đường nuôi cấy tế bào thực vật ?

CHƯƠNG 6

NUÔI CẤY MÔ VÀ TẾ BÀO TRONG CHỌN TẠO GIỐNG THỰC VẬT

TÓM TẮT CHƯƠNG

Nuôi cấy mô tế bào trở thành công cụ hữu ích cho công tác chọn tạo giống cây trồng. Chọn tạo giống được thực hiện thông qua hai hình thức: chọn dòng biến dị soma và biến dị giao tử thông qua nuôi cấy thể đơn bội. Các biến dị xuất hiện chủ yếu trong nuôi cấy là do những thay đổi về số lượng và cấu trúc của nhiễm sắc thể của tế bào. Các yếu tố như kiểu gene, chất điều hoà sinh trưởng có ảnh hưởng lên tần số biến dị soma. Để chọn lọc được các dòng biến dị soma có thể sử dụng phương pháp chọn trực tiếp hoặc chọn gián tiếp. Các yếu tố như kiểu gene, trạng thái sinh lý, thành của bao phấn nuôi cấy; môi trường nuôi cấy, nhiệt độ, ánh sáng… cũng ảnh hưởng đến nuôi cấy đơn bội trong chọn lọc biến dị giao tử. Trong khuôn khổ tạo giống cây trồng, chọn lọc biến dị soma và giao tử có thể được sử dụng để khám phá ra các thể biến dị mới duy trì tất cả các đặc tính tốt và bổ sung các tính trạng hữu ích để phục vụ sản xuất.

6.1. Chọn tạo dòng biến dị soma

6.1.1. Giới thiệu chung

Kỹ thuật chọn tạo dòng tế bào đã ra đời rất sớm trong các nghiên cứu liên quan vi sinh vật. Nhưng ở thực vật bậc cao, kỹ thuật này mới được ứng dụng cách đây khoảng hơn hai thập kỉ. Người ta có thể tiến hành xử lý và chọn lọc các dòng tế bào thực vật từ 3 dạng nguyên liệu chính là callus, tế bào đơn và tế bào trần.

Mục đích chọn tạo dòng biến dị soma gồm:

- Chọn dòng tế bào chống chịu các điều kiện bất lợi của môi trường (chịu nóng, lạnh, phèn, mặn, khô hạn...);

- Chọn dòng tế bào kháng các độc tố do nấm bệnh tiết ra, các loại kháng sinh;

- Chọn dòng tế bào sản xuất dư thừa các loại sản phẩm;

- Chọn các đặc điểm chỉ thị để nghiên cứu di truyền.

Hiện tượng biến dị di truyền thường xuất hiện tự nhiên ở các tế bào không phân hóa, các tế bào đơn, thậm chí các mô nuôi cấy *in vitro*. Nguyên nhân của biến dị chủ yếu là do những thay đổi về số lượng và cấu trúc của nhiễm sắc thể. Tính không đồng nhất của tế bào trong nuôi cấy tăng lên do các nhân tố sau:

- Nhiễm sắc thể ở trạng thái khảm hoặc có rối loạn di truyền ở các tế bào mẫu cấy ban đầu;

- Các tính trạng mới không theo quy luật do các điều kiện nuôi cấy gây ra.

Trong nuôi cấy mô, các kiểu thay đổi như thế thường bị loại bỏ khi mục đích chính là tăng các quá trình nuôi cấy ổn định di truyền. Những nghiên cứu gần đây cho thấy các mô và tế bào nuôi cấy thường trải qua những thay đổi di truyền như: đa bội (polyploidy), lệch bội (aneuploidy), đứt gãy nhiễm sắc thể (chromosomal breakage), khuyết đoạn (deletion), chuyển đoạn (translocation), khuếch đại gen (gene amplification), và đột biến (mutation). Những thay đổi này biểu hiện ở mức độ sinh hóa hoặc phân tử. Như vậy, nuôi cấy mô và tế bào thực vật có khả năng tạo biến dị di truyền tương đối nhanh và không cần phải ứng dụng các kỹ thuật phức tạp khác. Biến dị di truyền trong nuôi cấy mô có thể biểu hiện ở sự thay đổi tính trạng của các cây tái sinh. Tính trạng thay đổi này có thể truyền sang thế hệ sau bằng phương thức nhân giống hữu tính hoặc dinh dưỡng.

6.1.2. Cơ sở khoa học của biến dị soma

Các biến dị xuất hiện như là kết quả của những thay đổi tinh vi do các đột biến gene ở hệ gene nhân xuất hiện trong nuôi cấy. Các đột biến lặn không phát hiện được trong những tái sinh *in vitro* từ các tế bào hoặc mô bất kỳ, nhưng biểu hiện ở thế hệ tiếp theo khi tự thụ phấn. Thế hệ F_1 phân ly tính trạng quan tâm theo quy luật Mendel với tỷ lệ 3:1. Biến dị dòng soma của các đột biến lặn đơn gene cũng đã được tìm thấy ở nhiều cây trồng như ngô, lúa và lúa mì.

Những thay đổi trong hệ gene của tế bào chất cũng được quan sát ở các dòng soma. Ở cây ngô có hai tính trạng thuộc tế bào chất: (1) mẫn cảm với độc tố chiết từ *Drechslera maydis* nòi T, một tác nhân gây bệnh rụi lá, và (2) tế bào chất bất dục đực Texas (cms-T). Cả hai tính trạng này được mã hoá bởi các gene thuộc hệ gene ty thể.

Một hướng khác của đột biến đơn gene trong biến dị dòng soma liên quan đến nhân tố gọi là gen nhảy. Năm 1982, Chourey và Kemble đã phát hiện sự biến dị như là kết quả của sự xen đoạn của các DNA giống plasmid trong hệ gen ty thể của nuôi cấy tế bào ngô. Những thay đổi cảm ứng bằng gene nhảy được nghiên cứu chi tiết hơn ở các dòng thuốc lá, alfalfa và lúa mì.

Biến dị dòng soma xuất hiện cũng có thể do những thay đổi phân tử gây ra do hiện tượng trao đổi chéo nguyên phân ở các cây tái sinh. Hiện tượng này bao gồm hai trường hợp biến dị đối xứng và bất đối xứng. Những thay đổi nhỏ trong cấu trúc của các nhiễm sắc thể có thể dẫn đến những thay đổi về sự biểu hiện và chuyển giao di truyền của các gene đặc trưng, như: khuyết đoạn và nhân đoạn của một bản sao (hoặc nhiều bản sao) của một gene, hoặc sự biến đổi gen trong các quá trình sửa chữa. Sự tái tổ hợp về sau, hoặc đứt gãy nhiễm sắc thể ở vùng ưu tiên hoặc các "điểm nóng" di truyền của các nhiễm sắc thể dẫn đến thay đổi kiểu hình.

Các nghiên cứu gần đây cũng đã chứng minh rằng sự xuất hiện của những thay đổi trong DNA cơ quan tử thông qua hồ sơ protein và isoenzyme liên quan với sự xuất hiện của biến dị dòng soma ở một số loài thực vật như: lúa mì, lúa, khoai tây, ngô, lúa mạch và lanh.

6.1.3. Các yếu ảnh hưởng đến biến dị soma

6.1.3.1. Kiểu gene và mẫu vật

Kiểu gene ảnh hưởng lên tần số tái sinh cây và tần số biến dị soma. Ví dụ, một nghiên cứu khả năng tái sinh ở các thể đa bội của 18 thứ khác nhau của hai giống lúa cho thấy chỉ tái sinh được nhiều dạng bội thể khác nhau ở thứ indica mà không tái sinh được ở thứ japonica.

Mẫu vật được sử dụng từ nhiều nguồn mô khác nhau như: lá, rễ, lóng, bầu quả và hoa tự. Nguồn mẫu vật được xem là rất quan trọng trong việc xuất hiện biến dị soma. Nghiên cứu ở cây phong lữ (geranium) cho thấy các biến dị soma có thể thu được từ cành giâm cuống lá hoặc rễ *in vivo*, nhưng không thể từ cành giâm của thân. Cây dứa (*Ananas cosmosus*) phát triển từ callus của hom giâm, chồi đỉnh và chồi nách cho thấy chỉ có sự biến đổi ở đặc điểm của gai (spine), trong khi các cây phát triển từ callus của quả tụ cho thấy có sự biến dị ở màu lá, gai, lớp sáp và tán lá. Một quan sát khác cho thấy

có sự thay đổi hình thái ở 12,3% cây khoai tây tái sinh từ mảnh lá, ngược lại có tới 50,3% các cây biến dị có nguồn gốc từ callus của cuống bông và cuống lá. Các tác nhân chọn lọc khác nhau được sử dụng dựa vào các nguồn mẫu vật khác nhau trong nuôi cấy, tạo ra một dãy biến dị soma giữa các cây tái sinh.

6.1.3.2. Chất điều hòa sinh trưởng

Nồng độ cao của các chất điều khiển sinh trưởng ảnh hưởng đến sự thay đổi của kiểu nhân trong các tế bào nuôi cấy. 2,4-D cảm ứng biến dị nhiễm sắc thể ở các cây tái sinh trong nuôi cấy mô của lúa mạch và khoai tây khi hiện diện ở nồng độ cao trong môi trường. Tương tự, các dòng biến dị soma của các loài *Nicotiana* thu được từ mẫu lá trên môi trường có cung cấp BAP từ 5 - 10 mM. Các chất điều hoà sinh trưởng rất cần thiết cho cảm ứng phát sinh cơ quan và phân hóa chồi. Tuy nhiên, nồng độ cao của các chất này không cho phép tái sinh thành cây hoàn chỉnh trong nuôi cấy mô, và tỷ lệ chất điều hoà sinh trưởng trong môi trường cần được điều chỉnh cẩn thận trong các hệ thống nuôi cấy nhân giống *in vitro* để tạo ra các dòng biến dị soma.

6.1.4. Các phương pháp chọn tạo dòng biến dị soma

6.1.4.1. Phương pháp chọn trực tiếp

Thông qua ưu thế về sinh trưởng hay sự khác biệt về hình thái có thể chọn được dòng tế bào từ quần thể tế bào. Một số dòng có khả năng kháng kháng sinh, kháng các chất đồng đẳng của amino acid hoặc chống chịu muối cũng có thể chọn trực tiếp từ quần thể tế bào. Hệ thống tế bào hay được sử dụng là các tế bào dịch huyền phù hoặc callus. Điều kiện chọn lọc ở đây là các độc tố với nồng độ khác nhau gây tác động trực tiếp lên sinh trưởng của tế bào. Những tế bào có khả năng phân chia trong môi trường chứa độc tố với nồng độ tăng dần từ lần cấy chuyền này đến lần cấy chuyền khác được sàng lọc dần (chọn bậc thang). Bên cạnh đó, có thể đưa cả quần thể tế bào vào điều kiện môi trường ức chế sinh trưởng hoàn toàn để chọn ra những tế bào sống sót; tuy nhiên ngưỡng tối đa của mức độ hoặc nồng độ tác nhân chọn lọc cần phải được thăm dò trước nếu không có thể ức chế sự phát triển của các tế bào đột biến trong quần thể tế bào nuôi cấy. Thông thường, người ta trộn tế bào vào môi trường thạch chứa độc tố và chọn những tế bào sống sót phân chia thành khuẩn lạc mô sẹo, hoặc cũng có thể cấy trực tiếp lên môi

trường chọn lọc chứa độc tố. Dòng chống chịu thường xuất hiện từ một phần của khối tế bào nuôi cấy.

6.1.4.2. Phương pháp chọn tạo gián tiếp

Trong trường hợp này đặc điểm của dòng được chọn là kết quả biểu hiện khuyết của tế bào. Ví dụ điển hình là chọn dòng thiếu enzyme nitrate reductase (NR). Trên môi trường chứa ClO_3^- những tế bào có NR sử dụng ClO_3^- như NO_3^- và khử thành ClO_2^-, ClO_2^- có tác dụng như một độc tố cho nên chỉ có những tế bào không có NR mới sống sót trên môi trường chọn lọc.

6.1.4.3. Phương pháp chọn tổng thể

Các tế bào soma dị dưỡng thường được chọn bằng phương thức xử lý đột biến và nuôi trên môi trường có chứa yếu tố dinh dưỡng cần thiết có khi lại chính là yếu tố gây đột biến, ví dụ đột biến lặn chịu được S-2-aminoethyl cysteine xuất hiện sau khi xử lý đột biến phôi nuôi cấy.

Các dạng biến đổi chọn được trong nuôi cấy *in vitro* thường xuất hiện với tần số 10^{-5} - 10^{-8} khi không xử lý đột biến. Nếu xử lý sẽ tăng được tần số đó lên 10 lần.

Các tác nhân gây đột biến thường được sử dụng là:

- Ethylmethane sulphonate (EMS);

- N-methyl-N-nitro-N-nitroso guanidine (MNNG);

- N-ethyl-nitrosourea (ENU);

- Tia X hoặc tia UV.

Chưa có số liệu cụ thể về nồng độ, phổ và tần số đối với từng loại tác nhân bởi vì độ lớn của khối tế bào được xử lý, mật độ tế bào nuôi cấy trên đĩa petri và số nhiễm sắc thể cũng như kiểu nhân của tế bào bị xử lý. Sử dụng protoplast có thể là cách tiếp cận tốt nhất để giải quyết vấn đề này.

6.2. Chọn tạo dòng biến dị giao tử

6.2.1. Cơ sở khoa học của biến dị giao tử

Vật liệu di truyền trong các tế bào và mô được phân bố một cách bình thường như nhau thông qua quá trình nguyên phân. Ngược lại ở các giao tử, chúng là sản phẩm của quá trình giảm phân, nhận một nữa vật liệu di truyền theo các quy luật phân ly độc lập. Do đó, các tế bào đơn bội được hình thành từ giảm phân là nguồn nguyên liệu chính để chọn tạo các biến dị giao tử. Để phân biệt các dòng soma có nguồn gốc soma và các dòng giao tử có nguồn gốc giao tử, người ta dùng 3 thông số khác nhau.

- Thứ nhất, cả hai loại gene đột biến lặn và trội cảm ứng bởi biến dị dòng giao tử sẽ biểu hiện trực tiếp ở các cây đơn bội tái sinh từ tiểu bào tử của các bao phấn vì chúng sẽ có chỉ một bản sao của mỗi gene. Điều này cho phép phân tích trực tiếp các dòng giao tử (R_0) để xác định các thể biến dị mới.

- Thứ hai, các thể tái tổ hợp phát triển trong các dòng giao tử sẽ là kết quả của tổ hợp chéo giảm phân.

- Thứ ba, dòng giao tử có thể được dùng chỉ sau khi có được sự ổn định nhờ gấp đôi số lượng nhiễm sắc thể của nó.

Hầu hết các loài cây trồng đều có mức bội thể lớn hơn 1, phổ biến là nhị bội (2n) và tứ bội (4n). Như vậy, mỗi đặc điểm di truyền ở những cá thể này đều bị hai hay nhiều allen của một gene chi phối. Nếu đó là những cá thể dị hợp tử, tức là các gene trong mỗi hệ gene nhị bội hay tứ bội khác nhau thì biểu hiện tính trạng của gene đó hoàn toàn tùy thuộc vào tính trạng lặn hay trội của chúng quyết định. Vì vậy, mức bội thể lý tưởng để tiến hành nghiên cứu di truyền các tính trạng phải là mức đơn bội (1n) hoặc các mức đa bội khác nhưng chúng phải đồng nhất tuyệt đối.

Giá trị của cây đơn bội trong các nghiên cứu di truyền và chọn giống đã được phát hiện từ lâu. Kể từ khi Blakeslee (1921) mô tả cây đơn bội xuất hiện trong tự nhiên đầu tiên ở *Datura stramonium*, nhiều cây đơn bội đã được tìm thấy ở rất nhiều loài khác nhau. Tuy vậy, các thể đơn bội tự nhiên xuất hiện một cách ngẫu nhiên với tần suất rất thấp không thể đáp ứng yêu cầu của nghiên cứu và chọn giống. Năm 1964, lần đầu tiên trên thế giới, hai nhà khoa học ấn Độ Guha và Maheshwari thành công trong việc tạo cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn *in vitro* cây cà rốt *Datura innoxia*. Ngay sau đó, cây đơn bội đã được tạo ra bằng nuôi cấy bao phấn ở hàng loạt cây trồng khác nhau. Các

nhà khoa học đã tìm ra những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến thành công của quá trình nuôi cấy như ảnh hưởng của kiểu gene, giai đoạn phát triển của hạt phấn và các điều kiện môi trường nuôi cấy. Ngoài nuôi cấy bao phấn, các nhà khoa học còn có những thành công rất lớn trong nuôi cấy noãn chưa thụ tinh, nuôi cấy hạt phấn tách rời.

Kỹ thuật tạo cây đơn bội *in vitro* thông qua kích thích tiểu bào tử hoặc đại bào tử trong nuôi cấy hạt phấn và noãn cho phép tạo ra nhanh chóng hàng loạt cây đơn bội, phục vụ đắc lực cho mục đích nghiên cứu di truyền và tạo giống cây trồng. Hai phương pháp nuôi cấy tạo cây đơn bội hiện nay là:

- Nuôi cấy tiểu bào tử tách rời hay còn gọi là trinh sinh đực trong ống nghiệm;

- Nuôi cấy tế bào trứng chưa thụ tinh hay còn gọi là phương pháp trinh sinh cái trong ống nghiệm.

Vật liệu ban đầu cho quá trình nuôi cấy *in vitro* tạo cây đơn bội thường là:

- *Bao phấn, hạt phấn tách rời, cụm hoa*

Cụm hoa hay được áp dụng cho những loài có hoa nhỏ

- *Phôi sau lai xa:*

Khi lai xa giữa hai loài lúa mạch *Hordeum vulgare* và *H. bulbosum*, quá trình thụ phấn phôi đơn bội xảy ra, nhưng nội nhũ của phôi đơn bội lại không phát triển. Sử dụng phương pháp nuôi cấy phôi đã cứu được những phôi này và tạo ra hàng loạt cây đơn bội (Jensen, 1977);

- *Noãn thụ tinh giả:*

Đây là quá trình thụ phấn nhưng không xảy ra sự thụ tinh. Mặc dù vậy, tế bào trứng vẫn được kích thích phát triển thành cây đơn bội.

- *Noãn chưa thụ tinh:*

Trong số các vật liệu trên, bao phấn, hạt phấn tách rời và noãn chưa thụ tinh là những nguồn nguyên liệu quan trọng, được sử dụng phổ biến hơn để tạo cây đơn bội.

6.2.2. Các kiểu hình thành cây đơn bội in vitro

Nuôi cấy tạo cây đơn bội là cần thiết để thu được các dòng biến dị giao tử. Hiện tượng phát sinh cây đơn bội từ các tế bào giao tử đực của thực vật được gọi là sinh sản đơn tính đực. Người ta phân biệt 3 phương thức sinh sản đơn tính đực:

- Sinh sản đơn tính trực tiếp từ tiểu bào tử:

Tiểu bào tử trong bao phấn → Phôi → Cây đơn bội (n = 1). Cấu trúc dạng phôi phát triển trực tiếp từ hạt phấn. Quá trình này thường xảy ra trong bao phấn, ví dụ điển hình là ở cây thuốc lá, cà rốt.

- Sinh sản vô tính qua callus:

Tiểu bào tử trong bao phấn → Callus → Chồi → Cây đơn bội (n = 1). Cây hoàn chỉnh phát triển từ khối callus, khối mô này thường phát triển ra ngoài bao phấn, ví dụ điển hình ở một số cây như lúa, cải, đại mạch.

- Sinh sản đơn tính hỗn hợp:

Giai đoạn phát triển callus xảy ra rất ngắn và khó nhận biết, ví dụ ở cây cà rốt và cà chua.

6.2.3. Các bước phát triển phôi của hạt phấn

Bình thường sau khi được giải phóng từ tứ tử hạt phấn chứa một nhân, giai đoạn này được gọi là giai đoạn hạt phấn đơn nhân. Sau đó nhân chia đôi tạo thành một nhân dinh dưỡng và một nhân sinh sản. Nhân sinh sản lại chia đôi tạo thành hai tinh tử (giai đoạn nảy mầm tạo thành ống phấn) làm nhiệm vụ thụ tinh kép cho noãn và nội nhũ của túi phôi. Sunderland (1970) cho rằng trong nuôi cấy *in vitro*, bước phát triển đầu tiên của hạt phấn vẫn xảy ra như bình thường cho tới giai đoạn hai nhân. Quá trình tạo phôi thường bắt đầu từ nhân sinh sản, nhân sinh dưỡng hay cả hai nhân, song chủ yếu là nhân sinh dưỡng, trong khi nhân sinh sản chỉ phân chia một vài lần rồi ngừng hẳn. Có trường hợp ngoại lệ cây đơn bội phát triển từ nhân sinh sản nhưng thường rất yếu. Cũng có ý quan sát cho rằng phần lớn phôi *Hyoscyanus niger* thu được bằng nuôi cấy bao phấn có nguồn gốc nhân sinh sản. Về nguyên tắc, thì kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* cho phép tạo được đơn bội bằng nhiều phương thức khác nhau, nhưng phương thức bắt đầu từ tiểu bào tử vẫn là tiện lợi nhất.

6.2.4. Các yếuố ảnh hưởng đến nuôi cấy bao phấn

6.2.4.1. Kiểu gene của cây cho bao phấn

Kiểu gene của cây mẹ có vai trò rất quan trọng trong việc xác định tần số sản xuất cây hạt phấn. Ở lúa mì, tần số cảm ứng của callus hạt phấn và sự tạo thành cây xanh tiếp sau đó được điều khiển bởi nhiều gene. Mỗi kiểu gene khác nhau tương ứng với phản ứng sinh sản đơn tính khác nhau trong nuôi cấy bao phấn. Vì thế, đây là vấn đề cần lưu ý để chọn lọc chỉ các kiểu gene có phản ứng cao, còn hơn là tập trung chú ý đến việc cải thiện các điều kiện cho hệ thống nuôi cấy trong nuôi cấy bao phấn.

6.2.4.2. Thành bao phấn

Hạt phấn của một giống thuốc lá sẽ phát triển thành phôi ngay cả khi chuyển vào bao phấn của một giống khác. Chính kết quả này đã đưa ra khái niệm "nhân tố thành" và nó giúp đỡ cho nhiều nhà nghiên cứu sử dụng "hiệu ứng bảo mẫu" của bao phấn hoàn chỉnh để phát triển sinh sản đơn tính ở các hạt phấn phân lập của nhiều loài.

Dịch chiết của bao phấn cũng có tác dụng kích thích sản xuất phôi hạt phấn. Các nghiên cứu về mô học đã xác định vai trò của nhân tố thành bao phấn trong việc phát triển phôi hạt phấn. Một số kết quả nghiên cứu cho thấy glutamine riêng rẽ hoặc phối hợp với serine và myo-inositol có thể thay thế nhân tố thành bao phấn trong các thí nghiệm nuôi cấy hạt phấn phân lập.

6.2.4.3. Môi trường nuôi cấy

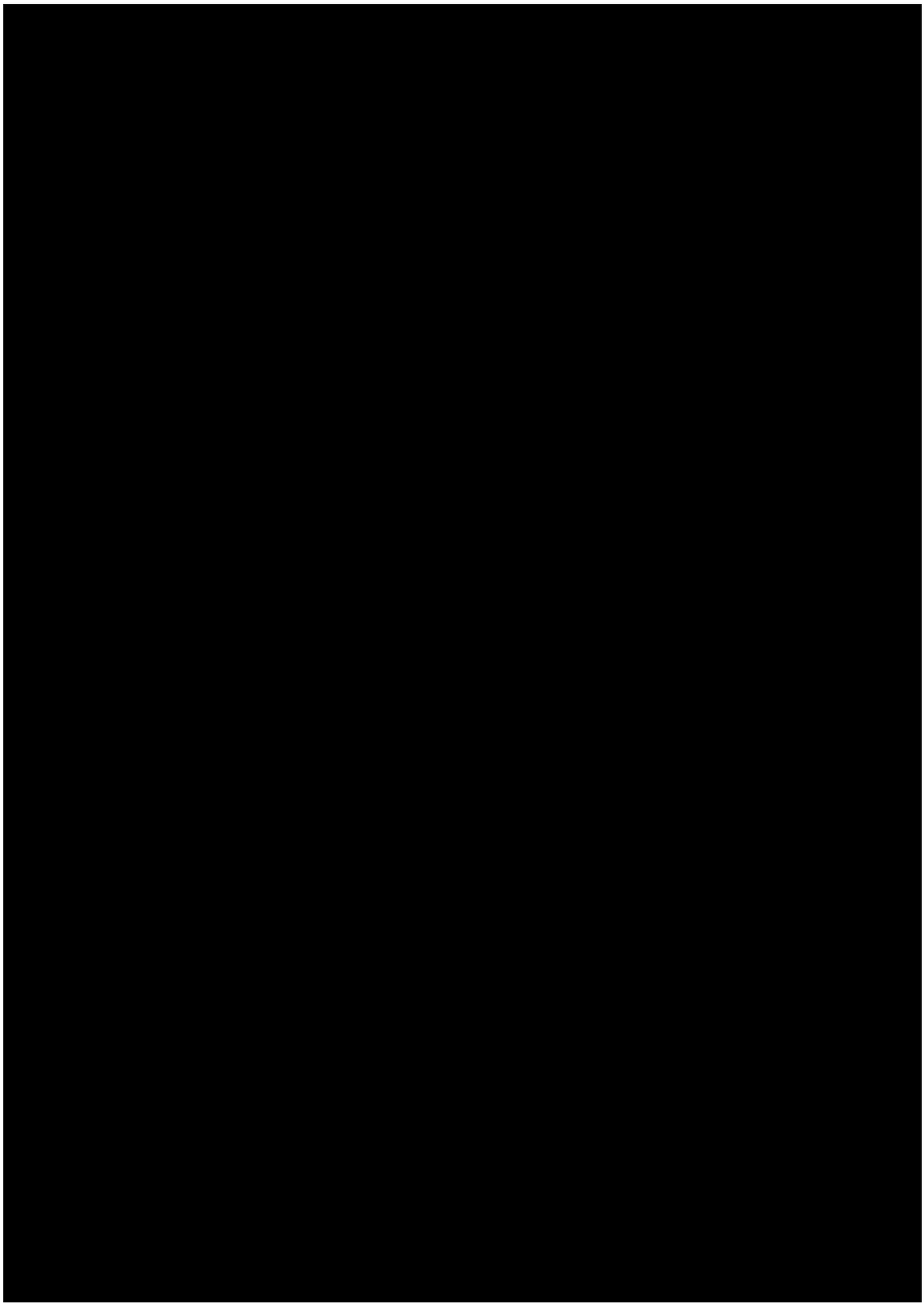
Thành phần môi trường nuôi cấy thay đổi tùy thuộc vào kiểu gene và tuổi của bao phấn cũng như các điều kiện mà ở đó cây cho bao phấn sinh trưởng. Sinh sản đơn tính tiểu bào tử ở *Nicotiana tabacum* và *Datura innoxia* có thể được cảm ứng trên môi trường agar đơn giản chỉ chứa sucrose. Hạt phấn tiếp tục phát triển trên môi trường như thế cho đến giai đoạn hình cầu. Quá trình sinh trưởng về sau của phôi hạt phấn đòi hỏi bổ sung các muối khoáng vào môi trường. Tuy nhiên, hầu hết các loài thuộc họ Solanaceae chỉ phát triển sinh sản đơn tính trên môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh bao gồm các loại muối khoáng, vitamin và sucrose của Nitsch hoặc MS. Muối Fe (40 µM Fe-EDTA hoặc Fe-EDDHA) dường như quyết định chủ yếu cho sự phát triển phôi của hạt phấn 3 hoặc 4 tuần tuổi trong quá trình nuôi cấy.

Ở các loài không thuộc họ Solanaceae, thành phần môi trường bao gồm: các chất điều khiển sinh trưởng và các hỗn hợp dinh dưỡng phức tạp (như dịch chiết nấm men, dịch thủy phân casein, nước dừa). Môi trường N6 sau đó cũng được sử dụng cho nuôi cấy bao phấn của các loại ngũ cốc khác như lúa, lúa mạch đen. Trong khi nhiều loài cần có auxin và/hoặc cytokinin để cảm ứng sinh sản đơn tính thì đa số các loài thuộc họ Solanaceae chỉ cần môi trường cơ bản. Sucrose là một thành phần không thể thay thế của môi trường, thông thường người ta sử dụng ở nồng độ 2 - 4% nhưng các loài như *Brassica* cần nồng độ khoảng 10%. Thay thế sucrose bằng cách bổ sung glutathione, ascorbic acid và glucose cũng có tác dụng tương tự, kích thích sinh sản đơn tính ở lúa mạch đen. Bổ sung than hoạt tính hoặc 2-chloroethyl-phosphate vào môi trường nuôi cấy cũng có tác dụng kích thích sinh sản đơn tính ở một số hệ thống nuôi cấy.

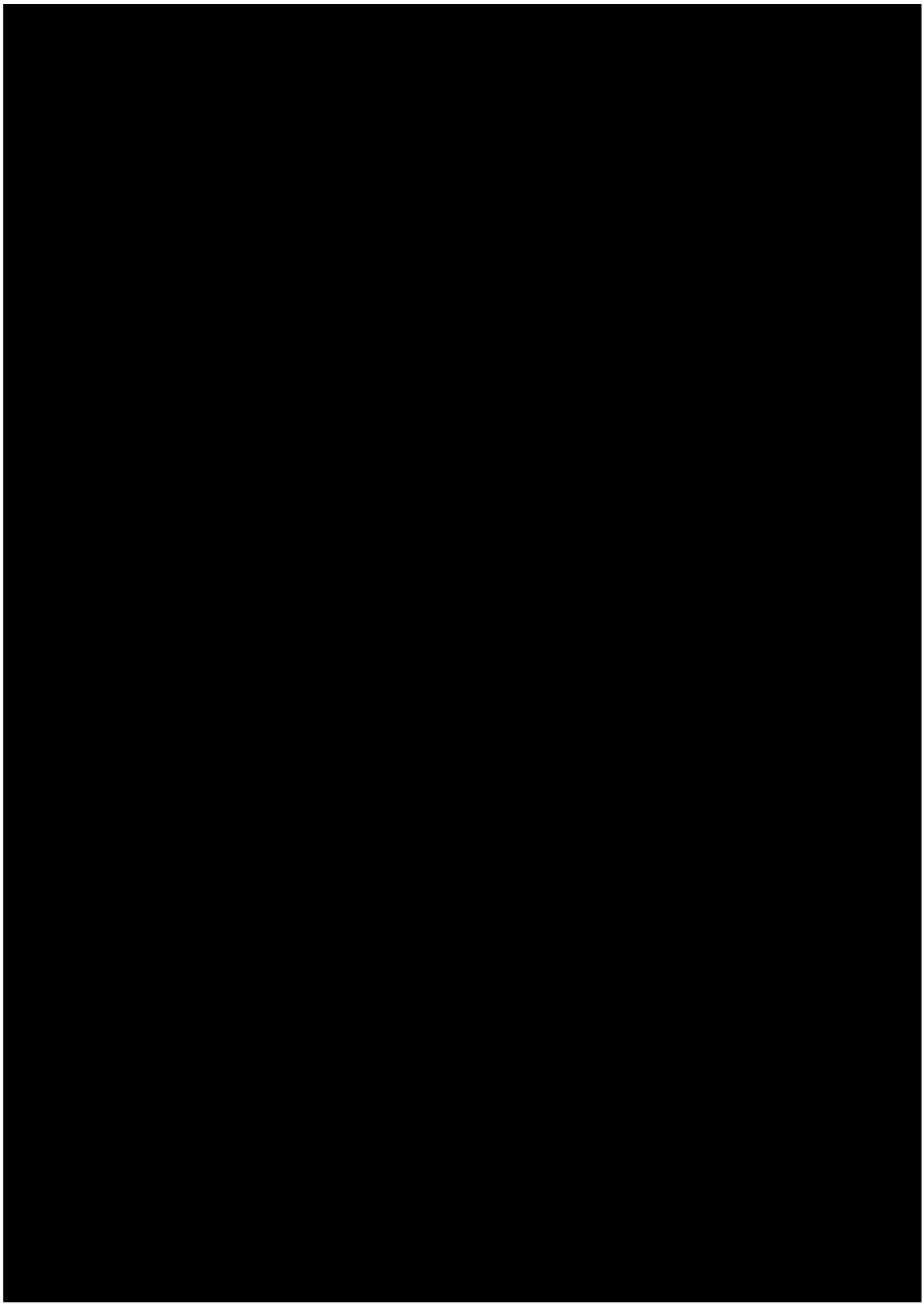
6.2.4.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và ánh sáng

Gây shock nhiệt sẽ tăng tần số sinh sản đơn tính tiểu bào tử. Xử lý lạnh ở 3°C hoặc 5°C/72 giờ kích thích hạt phấn phát triển thành phôi (xấp xỉ 58%) ở một số loài thuộc họ Solanaceae (*Datura, Nicotiana*). Ngược lại, bao phấn được duy trì ở 22°C trong cùng thời gian chỉ cho khả năng phát triển phôi khoảng 21%. Nói chung, gây shock nhiệt từ 2 - 5°C/72 giờ có tác dụng kích thích sự phát triển không bình thường của giao tử đực và tích lũy hạt phấn đơn nhân (ức chế sự phát triển tiếp ở các giai đoạn sau). Cụm hoa hình chùy được tách rời của lúa khi xử lý ở 13°C/10 - 14 ngày cho tần số hạt phấn tạo callus cao nhất. Cảm ứng sinh sản đơn tính sẽ có hiệu quả cao nếu bao phấn của các loại ngũ cốc khác (lúa, ngô, pennisetum) được bảo quản ở nhiệt độ thấp trước khi nuôi cấy.

Một số kết quả nghiên cứu cho thấy tiền xử lý bao phấn ở nhiệt độ 35°C đã kích thích sinh sản đơn tính ở một số loài *Brassica* và *Capsicum.* Tần số phát sinh cây đơn bội và sinh trưởng của cây nói chung sẽ tốt hơn nếu chúng được nuôi trong điều kiện chiếu sáng, mặc dù cây hạt phấn của một số kiểu gen sinh trưởng trong cả hai điều kiện có chiếu sáng và trong tối. Tuy nhiên, các hạt phấn phân lập dường như mẫn cảm với ánh sáng hơn so với bao phấn. Ánh sáng trắng cường độ thấp hoặc ánh sáng huỳnh quang đỏ kích thích phát triển nhanh hơn của phôi trong nuôi cấy hạt phấn thuốc lá phân lập so với với ánh sáng trắng cường độ cao.



các phương pháp tạo giống cây trồng truyền thống và không truyền thống đã được chứng minh là rất khó khăn. Biến dị soma có thể là một kỹ thuật thích hợp cho công nghệ di truyền các cây trồng này.



CHƯƠNG 7

BẢO TỒN NGUỒN GENE *IN VITRO*

TÓM TẮT CHƯƠNG

Đa dạng nguồn gene thực vật đang bị đe doạ nghiệm trọng bởi nhiều yếu tố tác động từ môi trường tự nhiên và con người. Các giải pháp bảo tồn nguyên vị và chuyển vị đã được áp dụng thành công để duy trì sự đa dạng. Tuy nhiên, các giải pháp bảo tồn này vẫn còn nhiều hạn chế và rủi ro. Bảo tồn in vitro duy trì nguồn gene ở dạng sống (mầm) trong điều kiện in vitro với nhiều ưu điểm vượt trội. Các mô, tế bào được nuôi cấy và duy trì bằng các kỹ thuật nuôi cấy và phương pháp bảo quản khác nhau. KHả năng tái sinh và thời gian bảo quản phụ thuộc vào dạng mẫu, kỹ thuật nuôi cấy và bảo quản. Chương này đề cập đến các phương pháp và kỹ thuật được ứng dụng với mục đích bảo tồn nguồn gene in vitro.

7.1. Giới thiệu chung về bảo tồn nguồn gene thực vật

Thực vật đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì sự đa dạng sinh học trên trái đất bằng cách cung cấp môi trường sống, thức ăn và oxy cho tất cả các sinh vật sống. Với khả năng chuyển đổi năng lượng mặt trời thành năng lượng hóa học, thực vật tổng hợp hàng nghìn hợp chất quan trọng cho cuộc sống của con người. Theo thống kê có hơn 8.000 loài thực vật hạt kín đang được sử dụng cho khoảng 10.000 bài thuốc, chiếm gần 25% các đơn thuốc được sử dụng ở các nước đang phát triển và nước phát triển (Bhojwani và Dantu, 2013). Khoảng 90% nguyên liệu thực vật của ngành công nghiệp dược phẩm có nguồn gốc từ các rừng nhiệt đới.

Quá trình chọn lọc tự nhiên và tiến hoá có thể dẫn đến sự tuyệt chủng của một loài thực vật nào đó. Tuy nhiên, với những biến đổi bất lợi của môi trường sống và tác động tiêu cực từ hoạt động sống của con người đã thúc đẩy quá trình tuyệt chủng diễn ra với tốc độ nhanh hơn so với sự xuất hiện của các loài mới. Đô thị hóa, công nghiệp hóa, các dự án thủy điện, phá rừng để mở đường và canh tác, và thu hái tận diệt là những

hoạt động của con người đe doạ đến đa dạng sinh học thực vật. Do đó, nếu các chiến lược phù hợp để bảo tồn nguồn gene không được phát triển kịp thời, chúng ta có thể mất đi nguồn tài nguyên thiên nhiên quý giá, thậm chí là nguồn gene có giá trị cho các chương trình nhân giống trong tương lai. Có 03 cách tiếp cận được các nhà bảo tồn áp dụng để gìn giữ nguồn tài nguyên thực vật, gồm: bảo tồn nguyên vị (*in situ*), bảo tồn chuyển vị (*ex situ*) và bảo tồn *in vitro*.

7.1.1. Bảo tồn nguyên vị

Bảo tồn nguyên vị là cách bảo vệ và nuôi dưỡng thực vật trong hệ sinh thái tự nhiên của chúng. Để bảo tồn có hiệu quả, cần thiết lập các quy định pháp luật trong việc khai thác, bảo tồn và khu bảo tồn sẽ thành lập dưới sự quản lí của một tổ chức nào đó. Tuy nhiên, thực tế giải pháp này vẫn tồn tại nhiều rủi ro tác động đến đối tượng bảo tồn, như: công tác quản lí yếu kém, ý thức của người dân còn hạn chế. Hơn nữa, nhiều loài có môi trường sống rất đặc biệt, khó tiếp cận, ví dụ những loài sống ở độ cao trên 3000 m, từ đó gây khó khăn cho công tác quản lí bảo tồn.

7.1.2. Bảo tồn chuyển vị

Với bảo tồn chuyển vị, các loài thực vật được di thực và nuôi trồng ở trong một khu vực không phải là môi trường sống tự nhiên của chúng, có sự chăm sóc và quản lí chặt chẽ, hoặc duy trì ở dạng hạt giống. Bảo quản hạt giống là một trong những phương pháp hữu dụng của bảo tồn chuyển vị vì có thể duy trì nguồn gene nguyên vẹn. Tuy nhiên, việc bảo quản nguồn gene ở dạng hạt giống sẽ gặp khó khăn đối với những hạt khó nảy mầm. Bảo tồn chuyển vị thường rất tốn kém và gặp phải rủi ro do dịch bệnh hoặc điều kiện khí hậu bất lợi.

7.1.3. Bảo tồn in vitro

Bảo tồn *in vitro*

quản. Một trong những chương trình sớm nhất ứng dụng bảo tồn *in vitro* là thành lập cơ sở vi nhân giống bảo tồn loài quý hiếm có nguy cơ tuyệt chủng tại Vườn Bách thảo Hoàng gia, Kew (Anh), vào năm 1974. Kể từ đó nhiều các quốc gia đã khởi xướng các chương trình để bảo tồn *in vitro* các loài nguy cấp. So với các giải pháp bảo tồn khác, bảo tồn *in vitro* có các ưu điểm sau:

- *Yêu cầu nguồn mẫu nhỏ*: Bảo tồn *in vitro* chỉ yêu cầu mô có kích thước nhỏ cho nuôi cấy và tái sinh. Các mẫu thực vật sử dụng thường không làm ảnh hưởng đến cây mẹ.

- *Hiệu quả kinh tế:* Do việc nuôi cấy chỉ cần một không gian tương đối nhỏ để lưu trữ với một số lượng lớn. Ví dụ, gần 6.000 giống sắn có thể được bảo tồn trong một phòng có kích thước 5 x 6 x 3 m. Ngoài ra, trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, cây không cần phải cắt tỉa và tách nhánh thường xuyên, do đó tiết kiệm được công lao động.

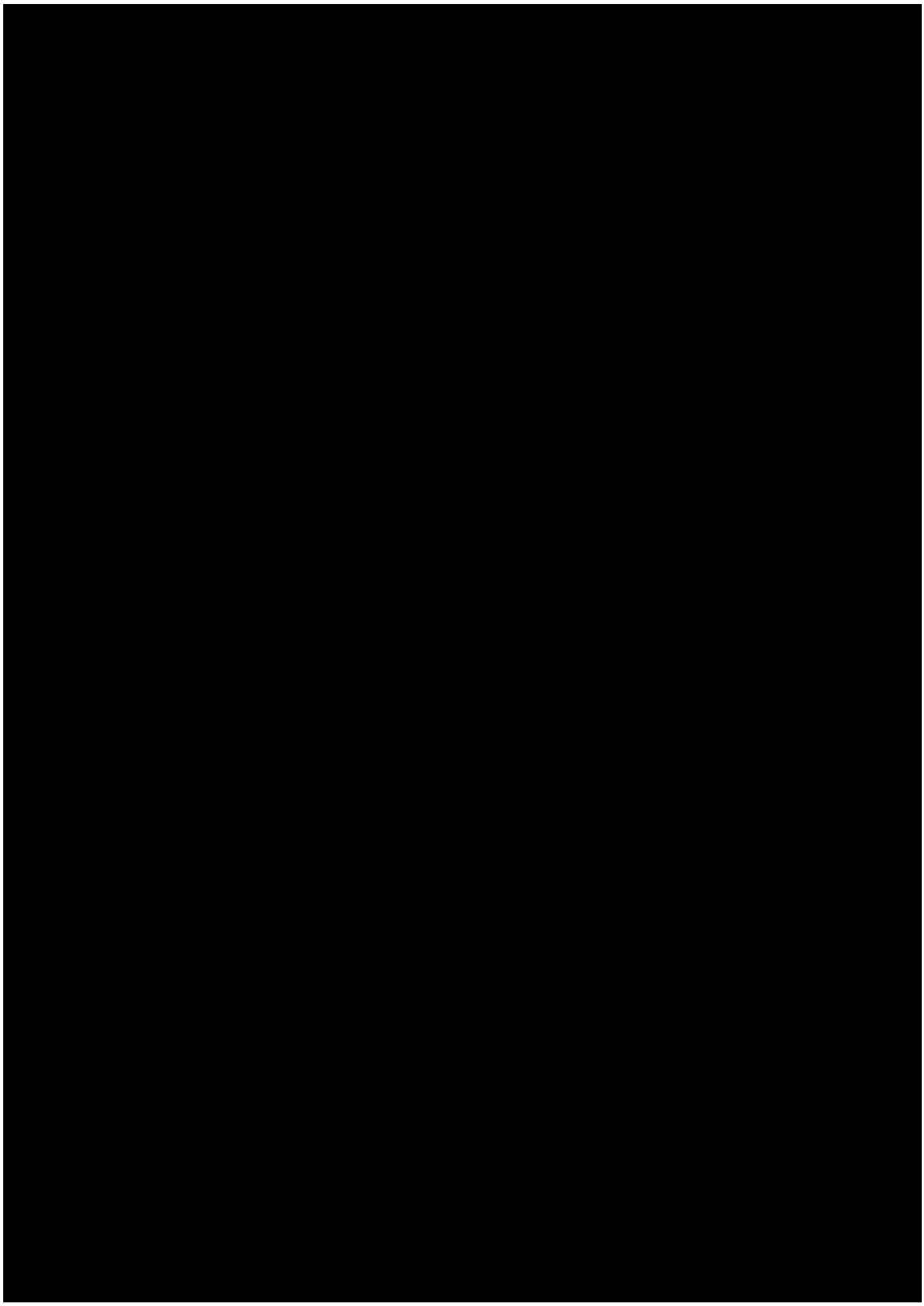
- *An toàn*: Cây được duy trì trong điều kiện không có sâu bệnh, mầm bệnh, virus và các mối nguy hiểm tự nhiên khác.

- *Tình huống đặc biệt*: Đối với các loại cây trồng, chẳng hạn như cacao, dừa và xoài có hạt kích thước lớn, thiếu khả năng ngủ và không có khả năng chịu được khô hạn hoặc tiếp xúc với nhiệt độ thấp, do đó nuôi cấy phôi *in vitro* là công cụ hữu ích để bảo tồn các nguồn gene này.

- *Trao đổi nguồn gene quốc tế*: Do dễ vận chuyển và mẫu không chứa mầm bệnh, nên giảm thiểu các trở ngại do hệ thống kiểm dịch đối với sự di chuyển của thực vật sống qua biên giới. Các nguồn gene có thể được trao đổi giữa các quốc gia nhằm phục vụ cho các mục đích khác nhau.

Tuy nhiên, trong một số trường hợp, các dạng sống được bảo tồn *in vitro* vẫn có thể bị ảnh hưởng bởi vấn đề nhiễm vi sinh vật trong các lần cấy chuyền. Do đó, cần nghiên cứu để giảm tần suất cấy chuyền đến mức tối thiểu. Trong một số trường hợp, chiến lược bảo tồn này cũng chưa mang lại hiệu quả kinh tế do chi phí đầu tư lớn hơn nhu cầu.

Bên cạnh các điều kiện nuôi cấy để tạo ra dạng sống thích hợp, việc bảo quản nguồn vật liệu này cũng đóng góp rất lớn vào sự thành công trong bảo tồn *in vitro*. Yêu cầu mà các phương pháp bảo quản cần hướng tới là kéo dài thời gian bảo quản mà không



7.2.2. Bảo quản trong môi trường thiếu oxy

Các mô, tế bào được duy trì trong điều kiện hàm lượng oxy hạn chế, thấp hơn nhu cầu oxy tối ưu cho sự sinh trưởng của mẫu. Cách đơn giản nhất để giảm nồng độ oxy là phủ lên mô cấy ở bên trong dụng cụ nuôi một lớp dầu khoáng. Mức độ hạn chế oxy phụ thuộc vào loài. Phương pháp bảo quản ở điều kiện thiếu oxy lần đầu tiên được sử dụng bởi Caplin vào năm 1959 với callus cà rốt. Sau đó, phương pháp này đã được áp dụng ở nhiều loài cây trồng khác. Ví dụ, phôi soma của cây cọ dầu có thể được bảo quản trong 4 tháng trong môi trường có 1% oxy, trong khi đó các phôi đối chứng được nuôi cấy trong điều kiện đủ oxy đã bị hư hại nghiêm trọng. Các dòng tế bào của *Panax ginseng* và *Catharanthus roseus* được bảo quản trong dầu khoáng vẫn duy trì khả năng trưởng trưởng tốt như các tế bào được bảo quản lạnh, mặc dù mất đi khả năng sinh tổng hợp một số thành phần hợp chất. Hạn chế về kỹ thuật chủ yếu khi bảo quản mẫu ở mức oxy thấp là hiện tượng thủy tinh hóa.

7.2.3. Bảo quản trong điều kiện môi trường không thuận lợi

Chồi thường là nguồn mẫu được sử dụng trong phương pháp này. Sự sinh trưởng của chồi được nuôi cấy có thể bị chậm lại khi bổ sung các chất có hoạt tính thẩm thấu, các chất ức chế sinh trưởng, giảm nồng độ dinh dưỡng khoáng, hoặc tăng nồng độ sucrose. Ở trong điều kiện này, chồi bị thiếu hụt đi nguồn dinh dưỡng hoặc ở trong trạng thái chống chọi với sự gia tăng của áp suất ngoại bào, do đó sinh trưởng bị chậm lại. Ví dụ, chồi cây lê có thể được bảo quản trong 2 năm ở 5°C trong môi trường dinh dưỡng cơ bản có tăng thêm 10% sucrose, hoặc tăng nồng độ agar lên 2%, hoặc giảm nồng độ muối khoáng xuống ¼ với tỷ lệ sống đạt 73 - 80%. Hầu hết các giống khoai tây tại Trung tâm khoai tây quốc tế (Lima, Peru) có thể được duy trì tới 4 năm mà không cần cấy chuyền bằng cách sử dụng kết hợp chất gây stress thẩm thấu (4% sorbitol).

7.3. Phương pháp bảo quản đông lạnh

7.3.1. Cơ sở của phương pháp

Phương pháp bảo quản đông lạnh (hay còn gọi là bảo quản dài hạn) được thực hiện bằng cách cấp đông mô, tế bào bằng nitrogen lỏng (-196°C) và bảo quản ở điều kiện nhiệt độ lạnh sâu. Ở nhiệt độ cực thấp này, mọi hoạt động trao đổi chất của tế bào bị ức chế. Do đó, về lý thuyết, các mẫu đông lạnh có thể được lưu trữ trong khoảng thời gian

không giới hạn mà không cần cấy chuyển. Tuy nhiên, để đạt được mục đích này thì cần đảm bảo tránh các tổn thương do quá trình cấp đông, bảo quản và tái nuôi cấy mẫu.

Trong hơn ba thập kỷ qua, có nhiều nghiên cứu nỗ lực để thiết lập các quy trình bảo quản đông lạnh các tế bào, mô và cơ quan thực vật khác nhau. Hàng trăm loài thực vật được bảo tồn thành công bằng phương pháp bảo quản này. Bảo tồn *in vitro* các nguồn gene bằng phương pháp đông lạnh ngày càng được sử dụng rộng rãi. Ví dụ, các chồi *in vitro* của cây bạch dương bạc có thể được bảo quản đông lạnh trong 5 năm vẫn cho thấy khả năng duy trì sự sống như các chồi không đông lạnh.

7.3.2. Các phương pháp bảo quản đông lạnh

Vấn đề chính trong bảo quản đông lạnh là bảo vệ các tế bào bằng cách ngăn chặn hoặc giảm thiểu sự hình thành tinh thể băng trong quá trình cấp đông. Có hai cách tiếp cận để cấp đông hiệu quả trước khi bảo quản:

- *Phương pháp cấp đông chậm:* hay còn gọi là phương pháp truyền thống. Phương pháp này làm đông mẫu theo quy trình giảm dần nhiệt độ từng mức cho đến nhiệt độ cuối (**Hình 7.1**);

- *Phương pháp đông nhanh*: Mẫu mô, tế bào nuôi cấy được cấp đông ngay lập tức bằng nitrogen lỏng, qua đó dừng ngay mọi hoạt động của mô tế bào. Phương pháp này ngày càng được áp dụng phổ biến vì khả năng duy trì chất lượng của mẫu.

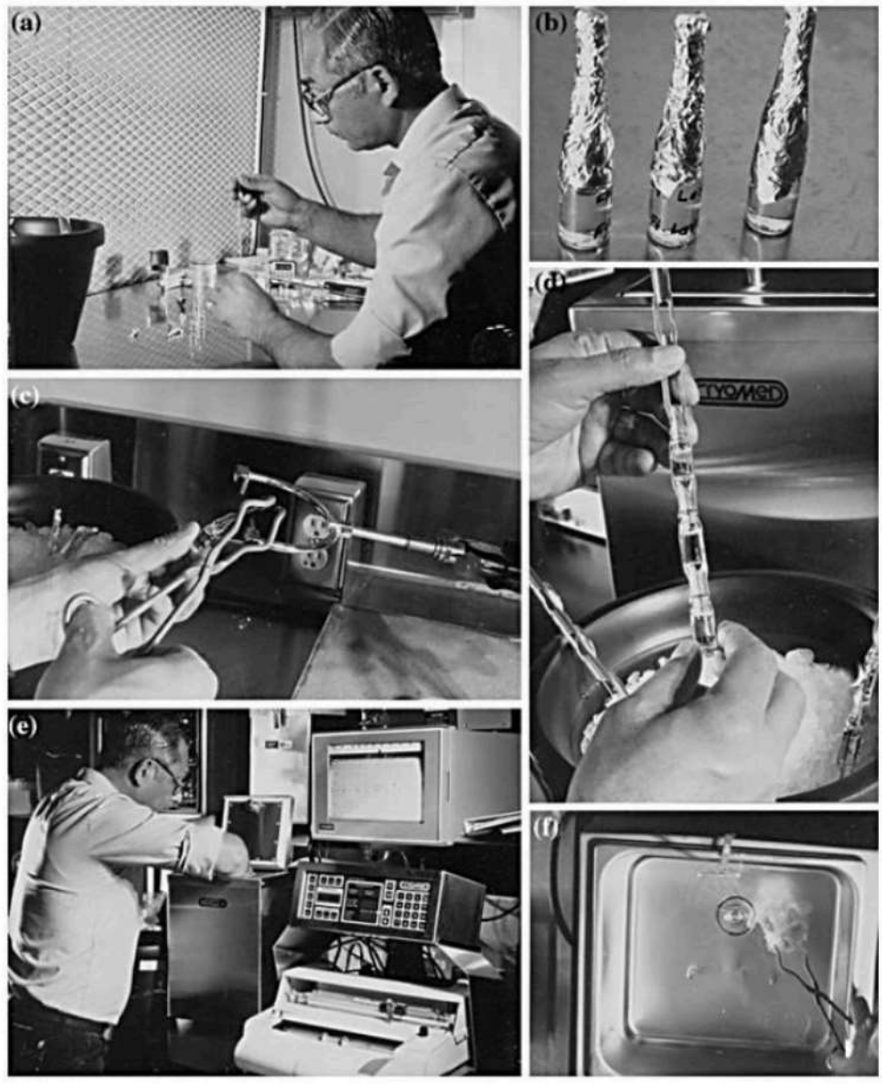
Cả hai phương pháp đều nhằm vào mục đích loại bỏ lượng nước nội bào thích hợp trước hoặc trong khi cấp đông. Do đó nguyên sinh chất trở nên cô đặc và ngăn chặn sự hình thành tinh thể băng. Để đạt được mục đích này, bước tiền nuôi cấy có ý nghĩa rất lớn trong việc tăng cường khả năng chịu mất nước của tế bào. Việc lựa chọn mô cũng góp phần vào sự thành công của phương pháp bảo quản.

7.3.3. Các bước của quy trình bảo quản đông lạnh

7.3.3.1. Chuẩn bị nguyên liệu thực vật

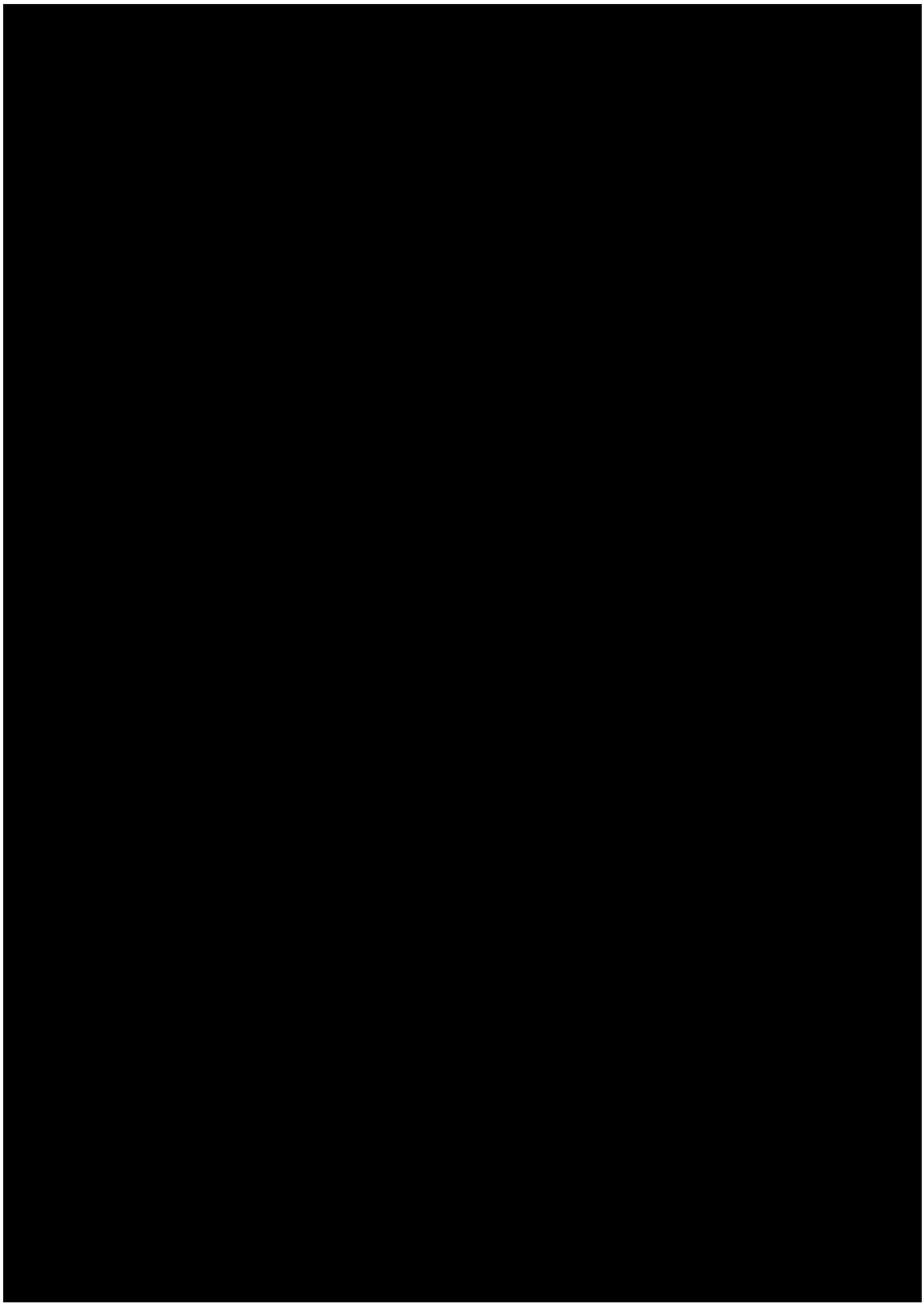
Nguyên liệu được bảo quản có thể là các khối callus, chồi đỉnh, phôi,… có kích thước nhỏ. Mẫu thực vật với các tế bào nhỏ và tế bào chất đậm đặc, đặc biệt là các tế bào ngay sau khi nguyên phân ở trong pha tăng trưởng của nuôi cấy huyền phù, thường thích hợp cho mục đích bảo quản vì chúng có khả năng chống chịu đông lạnh tốt. Ngược

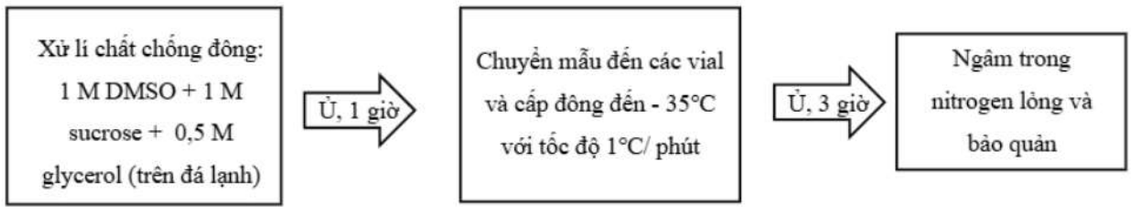
lại, các tế bào có không bào lớn thì rất nhạy cảm và sẽ khó sống sót khi rã đông. Các chồi đỉnh nhỏ hơn 1 mm rất dễ bị thủy tinh hóa khi cấp đông, dẫn đến tỷ lệ sống kém sau bảo quản. Kích thước hợp lý của mẫu chồi được bảo quản thành công là 1 - 1,5 mm. Bản chất của mô cũng có thể ảnh hưởng đến sự sống sót sau khi bảo quản. Ví dụ, phôi cây ôliu bảo quản đông lạnh cho thấy tỷ lệ sống sót cao hơn (38%) so với chồi ngọn (15%).



Hình 7.1. Các bước trong phương pháp bảo quản đông chậm (Bhojwani và Dantu, 2013).

Chú thích: Mô được cắt bỏ và xử lý bằng chất bảo vệ đông trong điều kiện vô trùng (a) và chuyển sang vial đông lạnh (b). Các vial được hàn kín bằng ngọn lửa (c) được đặt vào các hộp bảo quản (d), và sau đó được cấp đông trong tủ đông nitrogen lỏng với chương trình cấp đông được lập trình (e). Mẫu đông lạnh được rã đông nhanh chóng bằng cách nhúng các vial vào bể nước ở 37- 40°C (f).





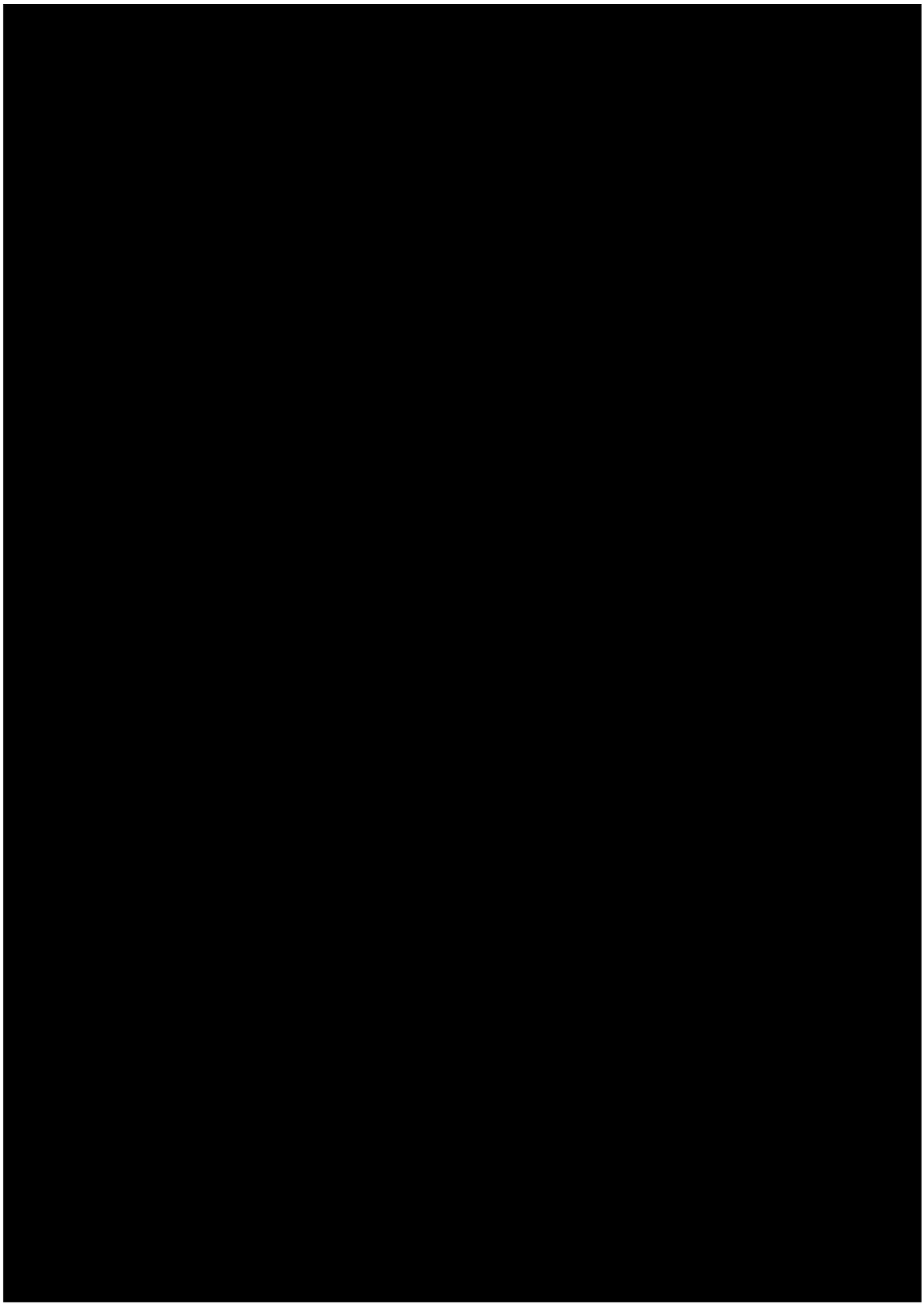
Hình 7.2. Các bước của phương pháp bảo quản đông chậm tế bào nuôi cấy huyền phù (Bhojwani và Dantu, 2013).

Tuy nhiên, quá trình loại bỏ nước nội bào có thể gây ra sự tổn thương do thay đổi thể tích và nồng độ các chất nội bào. Để ngăn chặn ảnh hưởng này, một số tác nhân bảo vệ, chẳng hạn như DMSO và glycerol có thể được sử dụng, chúng có thể bổ sung vào hỗn hợp dưới dạng riêng lẻ hoặc kết hợp. Đối với các tế bào nuôi cấy huyền phù, hỗn hợp 0,5% DMSO, 0,5% glycerol và 1 M sucrose được áp dụng rộng rãi. Trong một số trường hợp sucrose được sử dụng ở nồng độ 0,3 M ở trong môi trường nuôi cấy với tác dụng chống mất nước, sau đó nâng lên nồng độ 1 M trong hỗn hợp đông với vai trò chất bảo vệ đông. Mẫu thường được ủ trong dung dịch chất chống đông trên đá lạnh khoảng 1 h trước khi cấp đông. Chất chống đông đặc biệt quan trọng đối với các tế bào có không bào lớn. Ngoài ra, chúng cũng hoạt động như chất chống oxy hóa và chất ổn định màng tế bào.

- *Phương pháp cấp đông nhanh:*

Đầu tiên, mẫu được loại nước và sau đó ngâm trực tiếp vào nitrogen lỏng. Trong quá trình loại nước, nồng độ chất tan nội bào tăng, độ nhớt tăng. Khi tiếp xúc với nitrogen lỏng, phần nước còn lại của tế bào nhanh chóng chuyển pha, từ pha lỏng qua pha rắn (dạng thuỷ tinh). Quá trình chuyển pha này ngăn chặn các tổn thương đối với tế bào. Ngoài việc hạn chế tổn thương, ưu điểm của phương pháp cấp đông nhanh là đơn giản, áp dụng có hiệu quả đối với nhiều dạng mô khác nhau, và không đòi hỏi thiết bị lập trình chế độ cấp đông. Khi một quy trình cấp đông được thực hiện đúng cách thì các mô, đặc biệt là mô đỉnh sinh trưởng, được bảo vệ hoàn toàn. Các mô đỉnh sinh trưởng có thể tái sinh trực tiếp mà không cảm ứng qua trạng thái callus. Do đó, hạn chế sự biến dị di truyền.

Quá trình làm khô tế bào trước khi cấp đông được thực hiện bằng cách cho tế bào tiếp xúc với không khí vô trùng trong tủ vô trùng, dòng khí nén hoặc hoặc làm khô trên silica gel. Tuy nhiên, điều này chỉ áp dụng cho các mẫu vật không nhạy cảm với việc



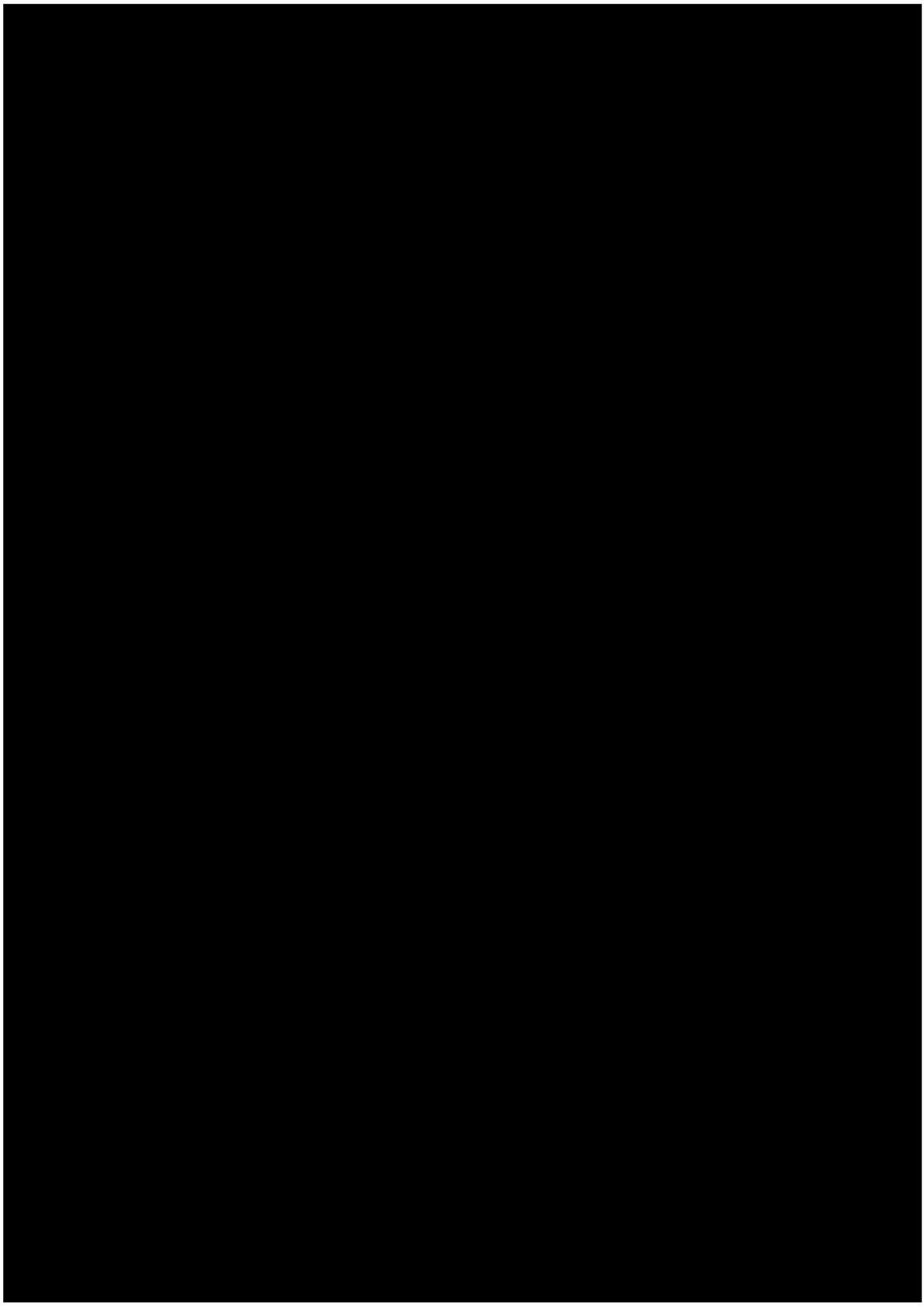
cần thiết vì sẽ ảnh hưởng đến mẫu. Thay vào đó, mẫu đã rã đông có thể được đặt trên môi trường nuôi cấy, từ đó chất chống đông được pha loãng dần dần. Bên cạnh đó, mẫu bị thủy tinh hóa hoặc mất nhiều nước cần nuôi cấy ở các môi trường có thẩm thấu giảm dần trong khi tái nuôi cấy.

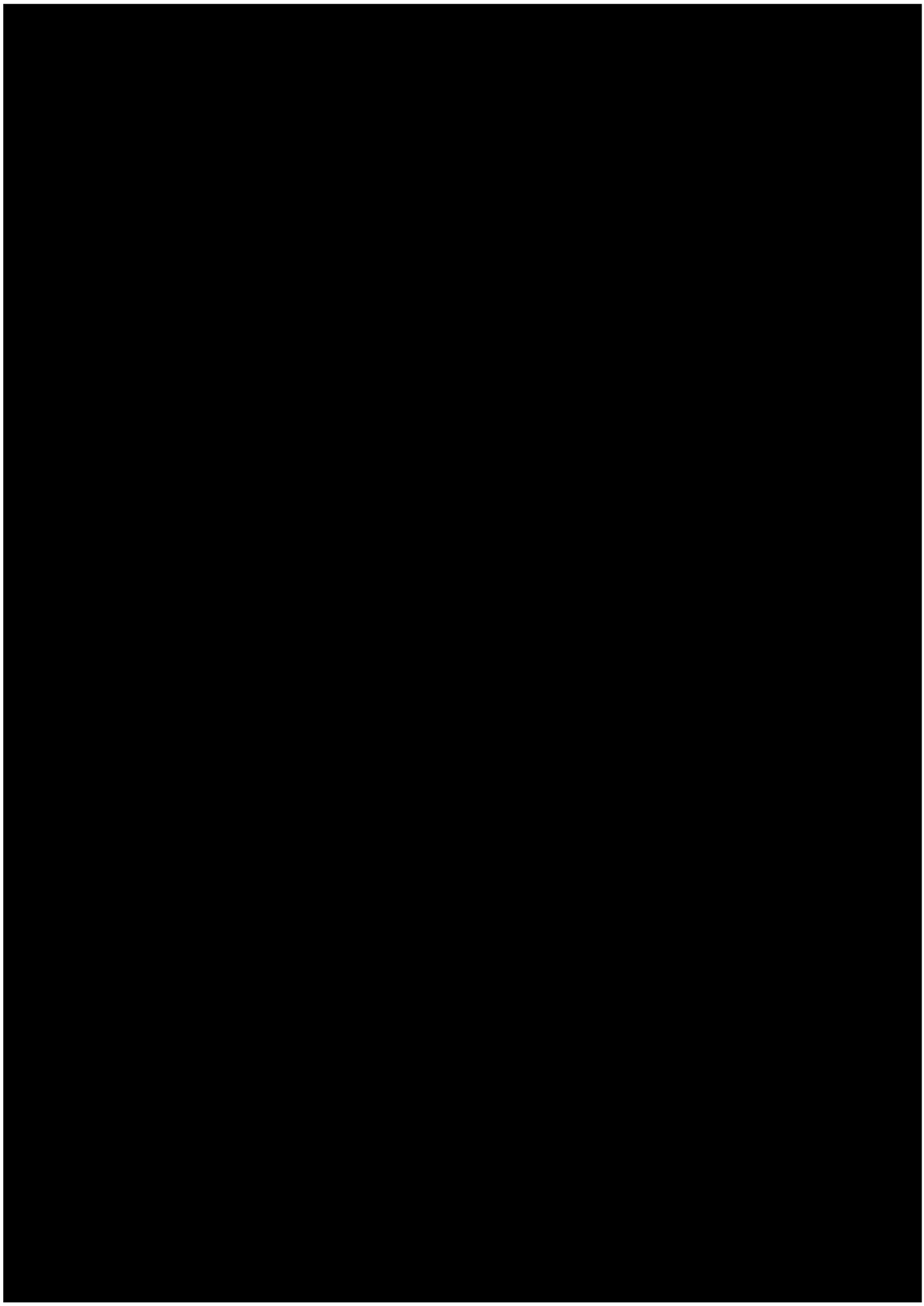
7.3.3.6. Tái nuôi cấy

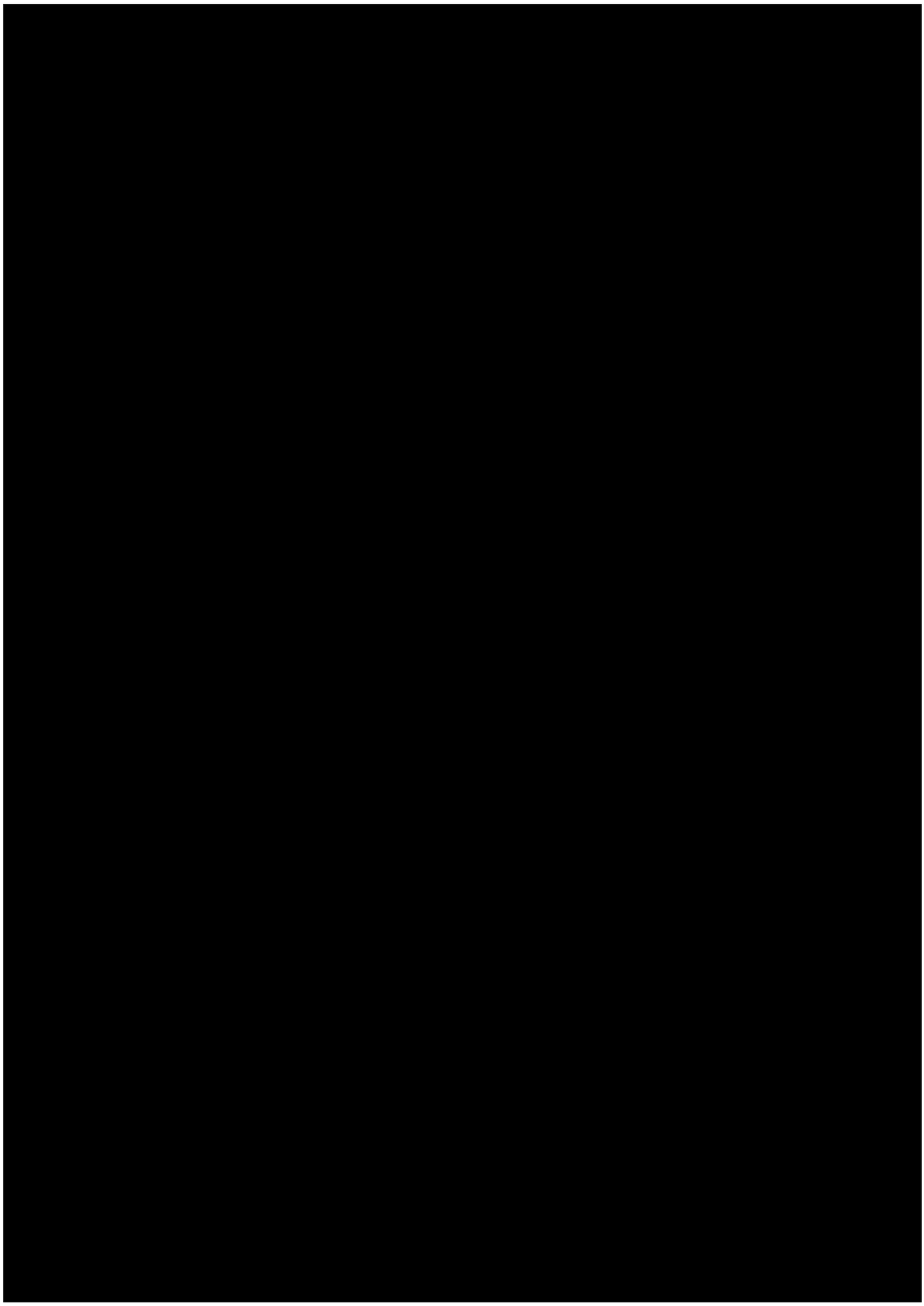
Môi trường nuôi cấy được sử dụng tương tự như đối với mẫu vật không được bảo quản đông. Tuy nhiên, một số trường hợp, thành phần môi trường và cách thức nuôi cấy có thể thay đổi. Ví dụ, chồi từ cây giống cà chua bảo quản đông phát triển trực tiếp thành cây con chỉ khi gibberellin được bổ sung vào môi trường. Khi không có gibberellin, quá trình tái sinh diễn ra gián tiếp thông qua callus.

7.3.3.7. Đánh giá tính ổn định của mẫu sau bảo quản

Kiểm tra khả năng sống và tính ổn định di truyền của mẫu sau bảo quản đông là cần thiết. Thử nghiệm tốt nhất về khả năng tồn tại là sự tái phát triển của mô, tế bào. Tuy nhiên, một số xét nghiệm mô học vẫn có thể được sử dụng để kiểm tra khả năng sống của tế bào một cách nhanh chóng. Tính ổn định di truyền của vật liệu có thể được kiểm tra bằng các chỉ thị phân tử.







các RNA polymerase khó tiếp cận để tiến hành phiên mã. Cấu trúc dị nhiễm sắc thường được tìm thấy ở vùng telomere và tâm động (centromere) của nhiễm sắc thể.

Kích thước và khối lượng của hệ gene nhân có sự thay đổi lớn, tuỳ thuộc vào loài thực vật. Khối lượng của hệ gene nhân của các loài thực vật bậc cao thay đổi từ khoảng 0,5 - 200 picrogram, trong khi kích thước ở dạng đơn bội dao động từ khoảng 63 - 149.000 Mbp (Harrison và Schmidt, 2012), chứa khoảng 100.000 - 120.000 gene với 25.000 - 40.000 gene mã hoá (Weaver, 2021). Tỷ lệ các cặp nucleotide (G + C)/(A + T) cũng đặc trưng đối với mỗi loài, ví dụ 36% ở cây Arabidopsis, 44% ở cây lúa.

Có hai dạng trình tự DNA khác nhau về số bản sao trong hệ gene nhân:

- Các trình tự tồn tại với số bản sao giới hạn: các trình tự này thường chỉ có một hoặc một số bản sao, thường là các gene mã hoá;

- Các trình tự lặp lại: chúng thường xuất hiện với số bản sao lớn trong hệ gene, chiếm phần lớn lượng DNA ở nhân (ví dụ: khoảng 85% ở cây đậu tằm). Các trình tự này không mã hoá protein, ví dụ như: các DNA vệ tinh (satellite), gene nhảy (transposon và retrotranposon) hoặc các đoạn trình tự ngắn có chức năng điều hoà.

8.1.2. Hệ gene bào quan

Lục lạp và ty thể là hai bào quan có chứa vật chất di truyền (ngoài nhân) ở thực vật. Vật chất di truyền tồn tại ở dạng phân tử DNA mạch vòng, một cấu trúc tương tự như plasmid của vi khuẩn. Chính sự tương đồng này cùng một số quan sát khác là cơ sở của giả thuyết cho rằng các bào quan này bắt nguồn từ các sinh vật nguyên thuỷ sống nội cộng sinh trong tế bào thực vật, hay còn gọi là thuyết nội cộng sinh (endosymbiont hypothesis). Hệ gene của các bào quan được di truyền độc lập với hệ gene nhân, tạo nên hiện tượng di truyền ngoài nhân hay di truyền tế bào chất. Ngoài hệ gene nhân, các công nghệ gene ngày này còn nhắm vào hệ gene bào quan với mục tiêu thay đổi những tính trạng gắn liền với các gene ở hai bào quan này.

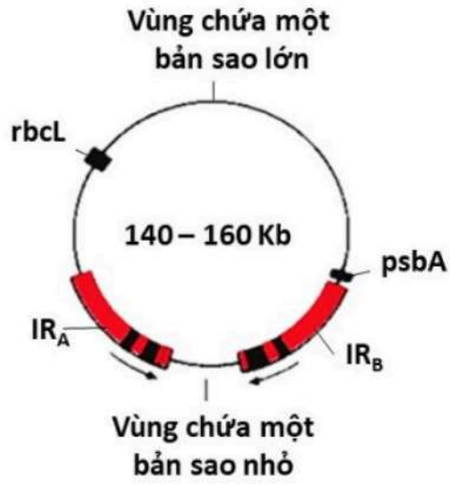
8.1.2.1. Hệ gene lục lạp

Lục lạp là bào quan chỉ xuất hiện ở thực vật, một số loại tảo, vi tảo và vi sinh vật. Năm 1962, sự tồn tại của vật chất di truyền và ribosome của lục lạp được phát hiện. Những bằng chứng thực nghiệm về sau cho thấy lục lạp chứa tất cả bộ máy di truyền

cần thiết cho hoạt động biểu hiện gene. Hệ gene lục lạp chủ yếu mã hoá cho RNA cấu trúc ribosome bào quan và các enzyme tham gia vào quá trình quang hợp.

Về căn bản, DNA lục lạp là một phân tử DNA mạch đôi dạng vòng, kích thước từ 120 -160 Kb, tồn tại với số lượng 20 - 40 bản sao trong mỗi bào quan, tuỳ thuộc vào loài. Tuy nhiên, các nghiên cứu mới đây lại cho rằng chỉ số lượng ít DNA lục lạp tồn tại dưới dạng vòng, còn hầu hết (khoảng 85%) là DNA mạch thẳng.

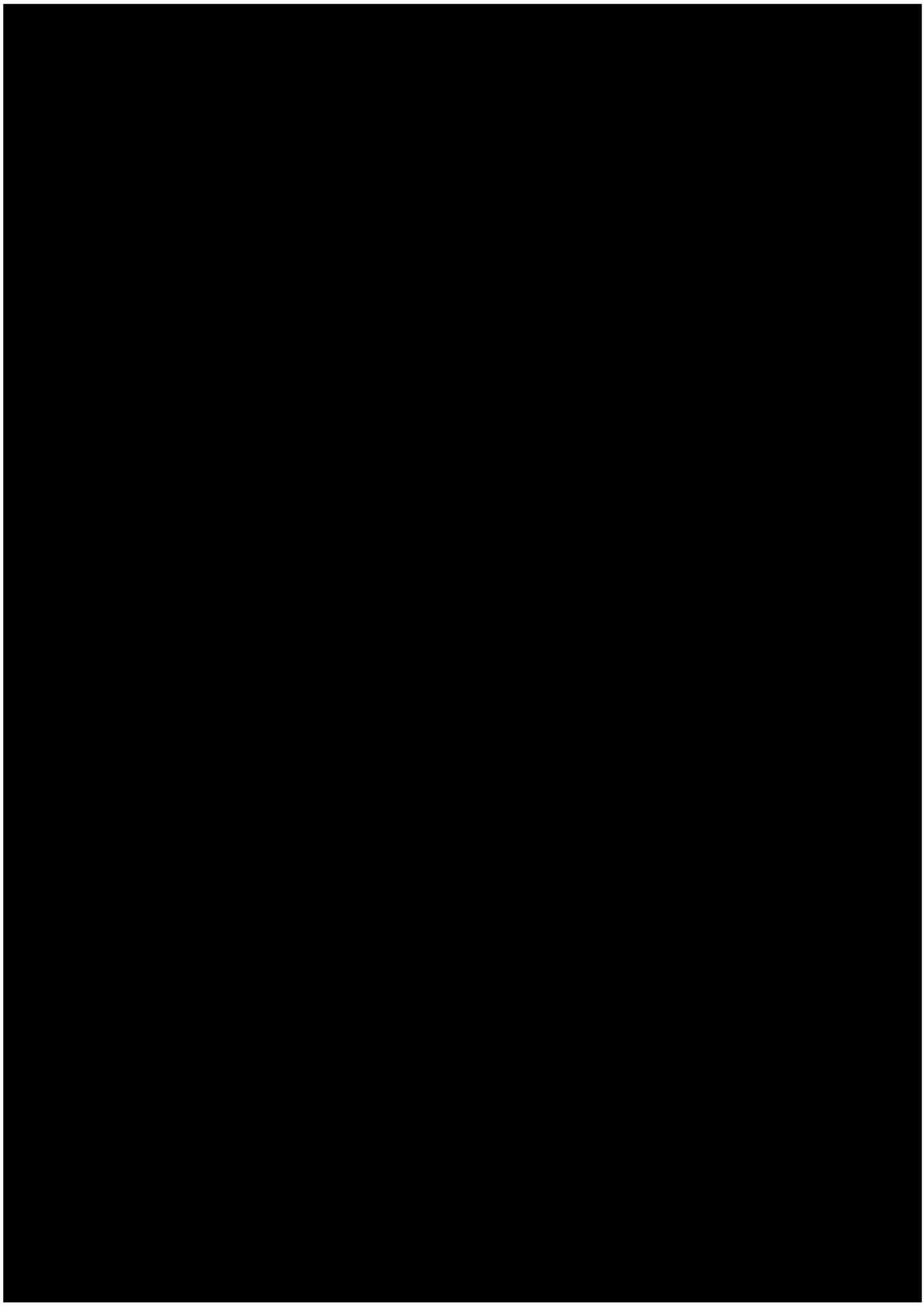
Mỗi phân tử cpDNA (ngoại trừ một số cây họ đậu) (**Hình 8.2**) thường chứa 2 đoạn lặp đảo ngược (IR_A và IR_B), chia phân tử mạch vòng thành một vùng lớn và một vùng nhỏ chứa các trình tự DNA chỉ có một bản sao. Mỗi đoạn lặp đảo ngược có kích thước khoảng 20 - 50 Kb, mã hoá cho 4 loại RNA của ribosome 70S ở lục lạp và một số RNA vận chuyển. Hệ gene lục lạp chủ yếu mang các gene mã hóa polypetide cần cho hoạt động chức năng của bào quan này, bao gồm các thành phần tham gia vào quang hợp như các tiểu phần của quang hệ I và II, phức hợp cytochrome-b_6f; ngoài ra cũng chứa các đoạn intron và một số gene chưa xác định chức năng. Phần lớn các protein cấu trúc của



Hình 8.2. Cấu trúc DNA lục lạp ở một số loài thực vật (thuốc lá, cải bó xôi và cà chua) (Heldt và Piechulla, 2021)

Chú thích: IR_A, IR_B - các đoạn lặp đảo ngược, *rbcL* - tiểu phần lớn của rubisco; *psbA* - một protein của quang hệ II.

lục lạp do các gene mã hoá ở hệ gene nhân. Do vậy, hoạt động tổng hợp protein của hệ gene nhân và lục lạp có quan hệ mật thiết với nhau. Có 2 loại RNA polymerase ở lục lạp: một loại được mã hoá bởi hệ gene lục lạp phiên mã cho những tiểu phần của hệ



chuỗi phản ứng hô hấp. Các tiểu phần khác không được mã hoá bởi hệ gene ty thể được mã hoá bởi hệ gene nhân. Thuyết nội cộng sinh cho rằng có khả năng phần lớn các gene mã hoá cho các tiểu phần trên ty thể đã được chuyển từ ty thể sang nhân.

8.2. Cấu trúc và biểu hiện của gene

Gene là một đoạn DNA mã hoá cho một sản phẩm RNA có chức năng. Các sản phẩm RNA được phiên mã có thể là một cấu trúc điều hoà độc lập (ví dụ: microRNA), một phần của bộ máy tế bào (ví dụ: tRNA, rRNA), hoặc mang thông tin mã hoá cho protein (mRNA). Các gene cấu trúc mã hoá cho các protein tương tự nhau về cấu trúc và chức năng có sự tương đồng về trình tự nucleotide được xếp cùng một họ gene, ví dụ: họ gene mã hoá cho tiểu phần nhỏ của rubisco.

8.2.1. Cấu trúc của gene

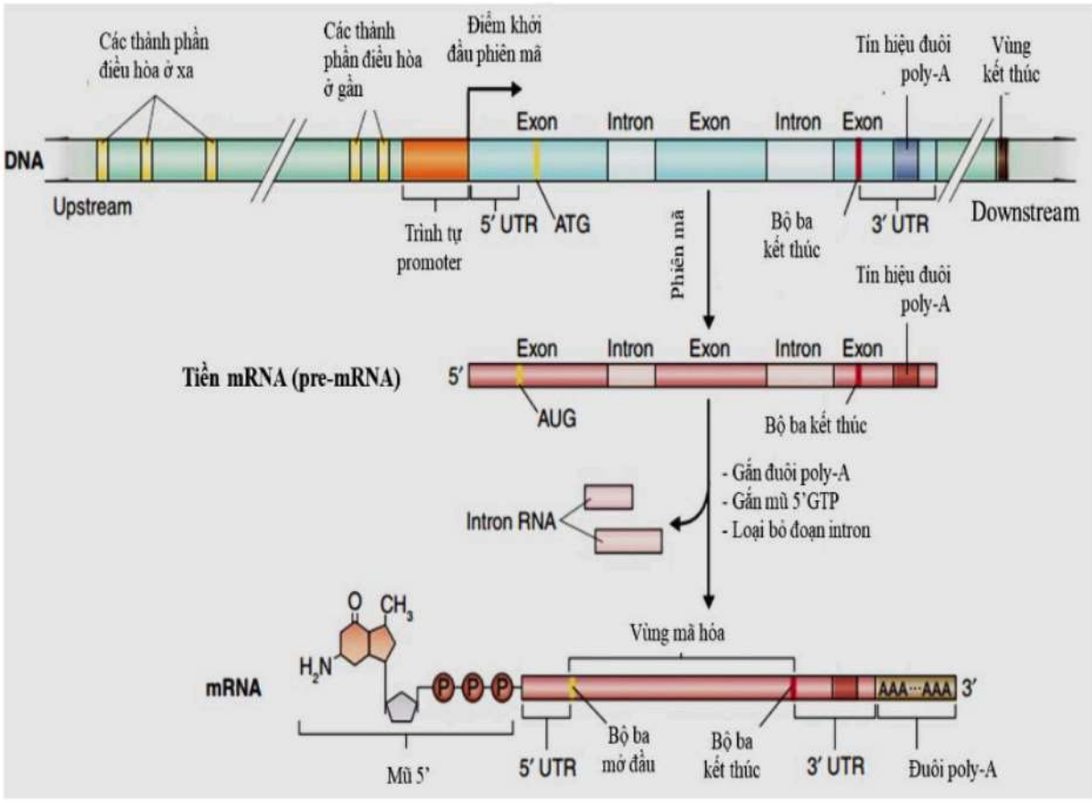
Thành phần cấu trúc của gene ở thực vật cũng tương tự như ở các sinh vật nhân thực khác, gồm hai vùng chính là vùng điều hoà (regulatory region) và vùng mã hoá (coding region).

Vùng điều hoà có chức năng điều khiển hoạt động phiên mã của gene, có thể cách rất xa hoặc gần điểm khởi động phiên mã. Vùng này không xuất hiện trong phân tử RNA sau khi phiên mã, thay vào đó định hướng cho bộ máy bắt đầu quá trình phiên mã. Các trình tự khác nhau ở vùng này đóng các vai trò chức năng khác nhau: tăng cường phiên mã, ức chế phiên mã, hoặc khởi động phiên mã.

Vị trí khởi động phiên mã (promoter) nằm ở vị trí cách điểm khởi đầu phiên mã khoảng 25 bp theo chiều "upstream" , đây là vị trí bám của RNA polymerase II. Trình tự của promoter có thể khác nhau tuỳ thuộc vào gene và loài sinh vật, tuy nhiên chúng thường được đặc trưng bởi một trình tự liên ứng (consensus) gọi là hộp TATA. Một trình tự liên ứng khác thường xuất hiện ở vị trí 80 - 110 bp theo chiều upstream là hộp CAAT. Ngoài ra, khoảng 1000 bp theo chiều upstream còn có các trình tự có chức năng điều hoà, hay còn gọi là các thành phần điều hoà dạng cis (cis-regulatory elements) như trình tự ức chế (silencer) hoặc tăng cường (enhancer) (**Hình 8.4**).

Tính từ đầu 5' của gene, vùng mã hoá bắt đầu từ điểm khởi đầu phiên mã, vùng này gồm các đoạn mã hoá protein (exon) nằm xen kẽ với các đoạn không mã hoá protein (intron), và kết thúc bằng bộ ba (codon) kết thúc. Ở đầu 5' của vùng mã hoá là một đoạn

DNA được phiên mã thành mRNA, nhưng lại không được dịch mã thành protein, đây được gọi là vùng không dịch mã (5' untranslated region, viết tắt: 5' UTR); tương tự ở đầu 3' sẽ là vùng không dịch mã 3' UTR. Các vùng không dịch mã này là một phần của exon, bởi chúng vẫn hiện diện trong phân tử mRNA trưởng thành. Khung đọc mở (open reading frame, viết tắt: ORF) là trình tự bao gồm exon nằm giữa codon khởi đầu (ATG) và codon kết thúc (UAA, UAG hoặc UGA).



Hình 8.4. Các thành phần cơ bản của một gene cấu trúc (Grotewold và cộng sự, 2015)

8.2.2. Biểu hiện gene

Phần lớn gene mang thông tin mã hóa cho một chuỗi polypeptide và được biểu hiện qua 2 giai đoạn: phiên mã (DNA → mRNA) và dịch mã (mRNA → chuỗi polypeptide).

8.2.2.1. Phiên mã

Quá trình phiên mã bắt đầu khi RNA polymerase II bám vào vùng promoter và sau đó tổng hợp mạch mRNA theo nguyên tắc bổ sung. Sản phẩm của quá trình phiên mã là một phân tử tiền mRNA (pre-mRNA). Phân tử tiền mRNA sau đó sẽ được xử lý để tạo

thành mRNA hoàn chỉnh, hay còn gọi là mRNA trưởng thành. Quá trình này gồm các hoạt động nhằm loại bỏ các đoạn intron, chỉ giữ lại các đoạn exon, gắn mũ ở đầu 5' và thêm đuôi polyA ở đầu 3'.

- Gắn mũ ở đầu 5': một phân tử GTP bị thuỷ phân tạo thành GDP và gắn vào đầu 5' của đoạn tiền mRNA, tạo thành một liên kết triphosphate. Mũ phosphate ở đầu 5' có chức năng là vị trí bám cho các phức hợp dịch mã bắt đầu quá trình tổng hợp protein và bảo vệ mRNA khỏi sự phân huỷ bởi các exoribonuclease.

- Gắn đuôi polyA ở đầu 3': đoạn gần cuối ở đầu 3' của tiền mRNA có một tín hiệu gắn đuôi polyA. Phần đầu 3' ngay sau tín hiệu này sẽ được cắt bỏ để thay thế bởi đuôi polyA.

8.2.2.2. Dịch mã

Dịch mã là quá trình sinh tổng hợp chuỗi polypeptide từ mRNA, diễn ra ở tế bào chất và có sự tham gia của các ribosome và tRNA. Ribosome là bộ máy sinh tổng hợp protein, được cấu tạo thành từ rRNA và một số protein. Các tRNA là các phân tử có khả năng nhận diện được cả RNA và amino acid. Hai giai đoạn chính của dịch mã là hoạt hoá amino acid, tạo thành phức hợp aminoacyl-tRNA nhờ enzyme aminoacyl-tRNA synthase và giai đoạn tổng hợp chuỗi polypeptide. Đầu tiên, tiểu phần 40S của ribosome nhận biết mRNA bắt đầu tổng hợp chuỗi polypeptide từ amino acid đầu tiên. Tiếp theo, tiểu phần 60S tiếp tục kéo dài chuỗi polypeptide cho tới khi gặp codon kết thúc và kết thúc dịch mã.

8.3. Điều hoà biểu hiện gene

8.3.1. Điều hoà biểu hiện gene ở mức độ nhiễm sắc thể

Cấu trúc và mức độ đóng xoắn của nhiễm sắc thể ảnh hưởng đến khả năng tiếp cận trình tự gene mục tiêu của các yếu tố tham gia quá trình phiên mã. Qua đó điều hoà hoạt động biểu hiện gene. Cấu trúc càng xoắn chặt thì hoạt động biểu hiện gene càng khó diễn ra và ngược lại. Do đó, các histone tham gia cấu trúc nhiễm sắc thể sẽ đóng vai trò quan trọng trong việc điều hoà biểu hiện gene.

Hầu hết các tế bào nhân thực đều chứa 5 loại histone: H1, H2A, H2B, H3 và H4. Những protein này tồn tại với số lượng rất lớn, có cấu trúc tương đối đơn giản, có độ

kiềm cao và khá tương tự ở các loài khác nhau. Khi các liên kết cộng hoá trị giữa các histone hoặc nhóm thành phần hoá học của chúng thay đổi sẽ ảnh hưởng tới cấu trúc của nhiễm sắc thể. Các nghiên cứu cho thấy sự metyl hoá ở vị trí Lys9 của histone H3 sẽ làm nhiễm sắc thể co xoắn hơn. Ngược lại, nếu acetyl hoá tại vị trí Lys9, Lys14 cùng lúc với phosphoryl hoá vị trí Ser10 của protein này dẫn đến cấu trúc "mở" của nhiễm sắc thể. Ngoài ra, monoubiquitinyl hoá ở vị trí lysine của H2B có thể ức chế hoặc kích hoạt phiên mã của gene, hoặc monoubiquitinyl hoá H1 sẽ khiến chúng rời khỏi sợi DNA. Những thay đổi này dẫn đến việc điều hoà biểu hiện của gene ở vị trí tương ứng.

8.3.2. Điều hoà biểu hiện gene ở mức độ phiên mã

Các trình tự thuộc vùng điều hoà của gene và thành phần tham gia vào quá trình phiên mã sẽ đóng vai trò chủ yếu trong việc điều hoà biểu hiện gene. Các thành phần điều hoà dạng cis: promoter, enhancer, silencer chứa các vị trí bám cho một số protein gọi là yếu tố phiên mã gọi là TF (transcription factor). Các TF được gọi là các thành phần điều hoà dạng trans, hoạt động của chúng nhờ chuỗi tín hiệu bắt nguồn từ các protoplast thực vật hoặc do các tác nhân khác. Tương ứng hai vùng trình tự, hai loại thành phần dạng trans, gồm activator và repressor, sẽ tương ứng bám vào các vùng enhencer hoặc silencer, qua đó điều hoà phiên mã bằng cách tạo ra các cấu trúc thứ cấp của gene như dạng vòng hoặc kẹp tóc.

8.3.3. Điều hoà biểu hiện gene ở mức độ sau phiên mã

8.3.3.1. Cắt nối RNA

Như đã đề cập ở **mục 8.2**, khung đọc mở của gene chứa các đoạn exon và intron. Các đoạn intron này đa dạng về chiều dài, số lượng và trình tự ở các loài khác nhau, tuy nhiên chúng thường có điểm chung là cặp nucleotide bắt đầu (GU) và kết thúc (AG), là các trình tự có độ bảo toàn rất cao. Các cặp nucleotide này, cùng với một số trình tự ở xa, là dấu hiệu để spliceosome nhận biết và cắt chính xác các đoạn intron khỏi phân tử tiền mRNA trong quá trình hình thành mRNA trưởng thành. Dù được biết đến là vùng không mã hoá, nhưng trong một số trường hợp cho thấy các đoạn intron lại chứa một phần thuộc khung đọc mở hoặc các trình tự điều hoà. Do đó, quá trình cắt nối RNA (alternative splicing), trong đó có giữ lại đoạn intron hay loại bỏ đoạn exon, thường sẽ

có vai trò nhất định trong điều hoà biểu hiện gene vì sẽ ảnh hưởng đến sản phẩm của dịch mã theo cách:

- Một là, tạo ra nhiều protein khác nhau từ một loại sản phẩm mRNA, ví dụ mRNA trưởng thành của gene *pyruvate Pi-dikinase* ở ngô có thể mã hoá cho 2 sản phẩm protein. Một dạng tham gia vào chu trình quang hợp C4 ở thịt lá, được dịch mã từ exon đầu tiên của mRNA, tức loại bỏ intron đầu tiên; một dạng khác tham gia vào các phản ứng ở tế bào chất để tạo nên phosphoenolpyruvate, được dịch mã từ mRNA chứa một vùng trình tự ở đầu 3' của intron đầu tiên.

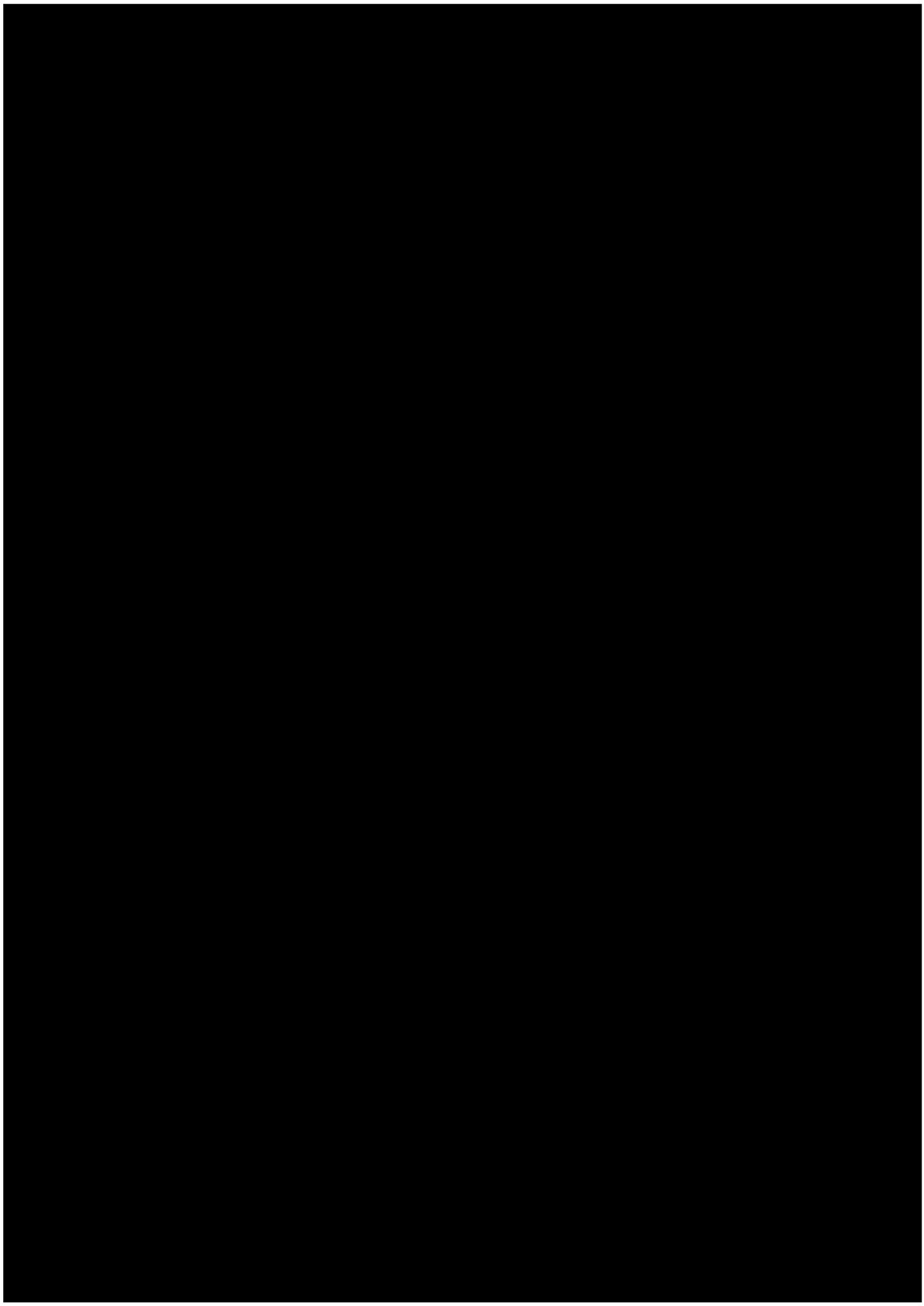
- Hai là, bảo toàn khung đọc mở của gene bằng cách dò tìm trên trình tự tiền mRNA và hạn chế sự xuất hiện của tín hiệu kết thúc dịch mã sớm (PTS). Tuy nhiên, một số trường hợp hoạt động cắt nối lại cũng có thể dẫn đến sự hình thành của các tín hiệu PTS. Để bảo toàn khung đọc mở, tế bào sẽ có những cơ chế khác để loại bỏ các khung đọc mở chứa PTS.

8.3.3.2. RNA can thiệp

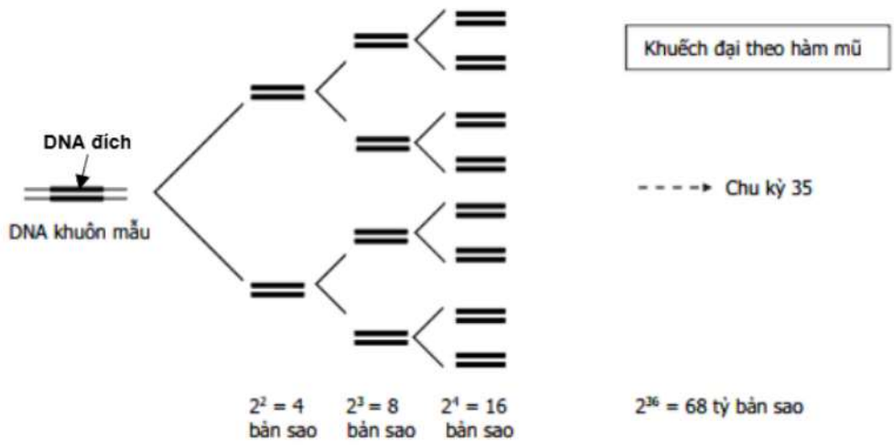
Hệ gene thực vật nói riêng, sinh vật nói chung tồn tại các trình tự mã hoá các phân tử RNA không mã hoá cho chuỗi polypeptide. Các trình tự này có liên quan chủ yếu tới quá trình điều hoà hoạt động của tế bào thông qua điều hoà biểu hiện gene. Tiêu biểu là nhóm các phân tử RNA ngắn với kích thước khoảng 21 nucleotide. Có 2 loại RNA ngắn thường được quan tâm là microRNA (miRNA) và RNA can thiệp ngắn (siRNA) có chức năng tương tự nhau dù con đường hình thành chúng có điểm khác biệt. Chúng tham gia vào quá trình ngăn cản quá trình dịch mã. Cơ chế ức chế dịch mã của chúng, hay còn gọi là gene silencing, bắt đầu bằng việc hình thành phức hợp ức chế RISC (RNA inducing silencing complex). Các phân tử miRNA hoặc siRNA bám vào đoạn mRNA mục tiêu theo nguyên tắc bổ sung dẫn đến phân hủy hoặc ức chế dịch mã đoạn mRNA.

8.3.3.3. RNA turnover

Các phân tử mRNA sau khi phiên mã được vận chuyển từ nhân ra tế bào chất để tiến hành quá trình dịch mã. Trong một số trường hợp, các mRNA không được dịch mã ngay vì yêu cầu sự có mặt sản phẩm dịch mã đối với chức năng của tế bào. Trong trường hợp này, các mRNA sẽ bị phá huỷ, thông thường bắt đầu từ đuôi polyA bằng enzyme



Thời gian ở mỗi bước tuỳ thuộc vào chiều dài, trình tự của đoạn DNA đích và các đoạn mồi thiết kế.



Hình 8.5. Sơ đồ phản ứng chuỗi polymerase PCR (Nguyễn Hoàng Lộc, 2007)

c. Một số lưu ý

Để PCR đạt được kết quả mong muốn, cần lưu ý một số điểm sau:

- DNA khuôn mẫu phải nguyên vẹn và không chứa các thành phần ức chế phản ứng xúc tác của enzyme;

- Trình tự đoạn mồi được thiết kế để khuếch đại đoạn DNA phải đặc hiệu. Cần tránh tạo ra các cấu trúc thứ cấp giữa trình tự mồi xuôi và mồi ngược;

- Nhiệt độ để gắn mồi trong chu trình nhiệt phụ thuộc vào nhiệt độ nóng chảy của đoạn mồi. Do đó, cần hạn chế sự chênh lệch giữa nhiệt độ gắn mồi của mồi xuôi và mồi ngược.

d. Ứng dụng

PCR là kỹ thuật phổ biến và không thể thiếu trong các phòng thí nghiệm nghiên cứu y học và sinh học với nhiều ứng dụng khác nhau như:

- Nhân bản ADN để giải trình tự;

- Phát hiện các trình tự mục tiêu cho nhiều mục đích khác nhau từ các đối tượng;

- Phân lập và tái tổ hợp các trình tự DNA quan tâm.

8.4.1.2. Phản ứng chuỗi trùng hợp phiên mã ngược

a. Nguyên lý

Phản ứng chuỗi trùng hợp phiên mã ngược (RT - PCR) là kỹ thuật khuếch đại các trình tự DNA từ đoạn mRNA khuôn mẫu với sự tham gia của enzyme phiên mã ngược reverse transcriptase.

Một phản ứng khuếch đại DNA bằng RT - PCR bao gồm hai giai đoạn:

- Tổng hợp sợi DNA bổ sung (cDNA) từ mRNA khuôn mẫu: Đầu tiên, mạch cDNA thứ nhất được tổng hợp từ mRNA khuôn mẫu bằng enzyme phiên mã ngược. Tiếp theo đó, đoạn mRNA khuôn mẫu được phân huỷ bằng enzyme Rnase H và mạch cDNA thứ hai được tổng hợp bằng mồi xuôi (được thiết kế dựa theo trình tự mRNA đã biết).

- Khuếch đại đoạn cDNA: Các bước khuếch tương tự như PCR.

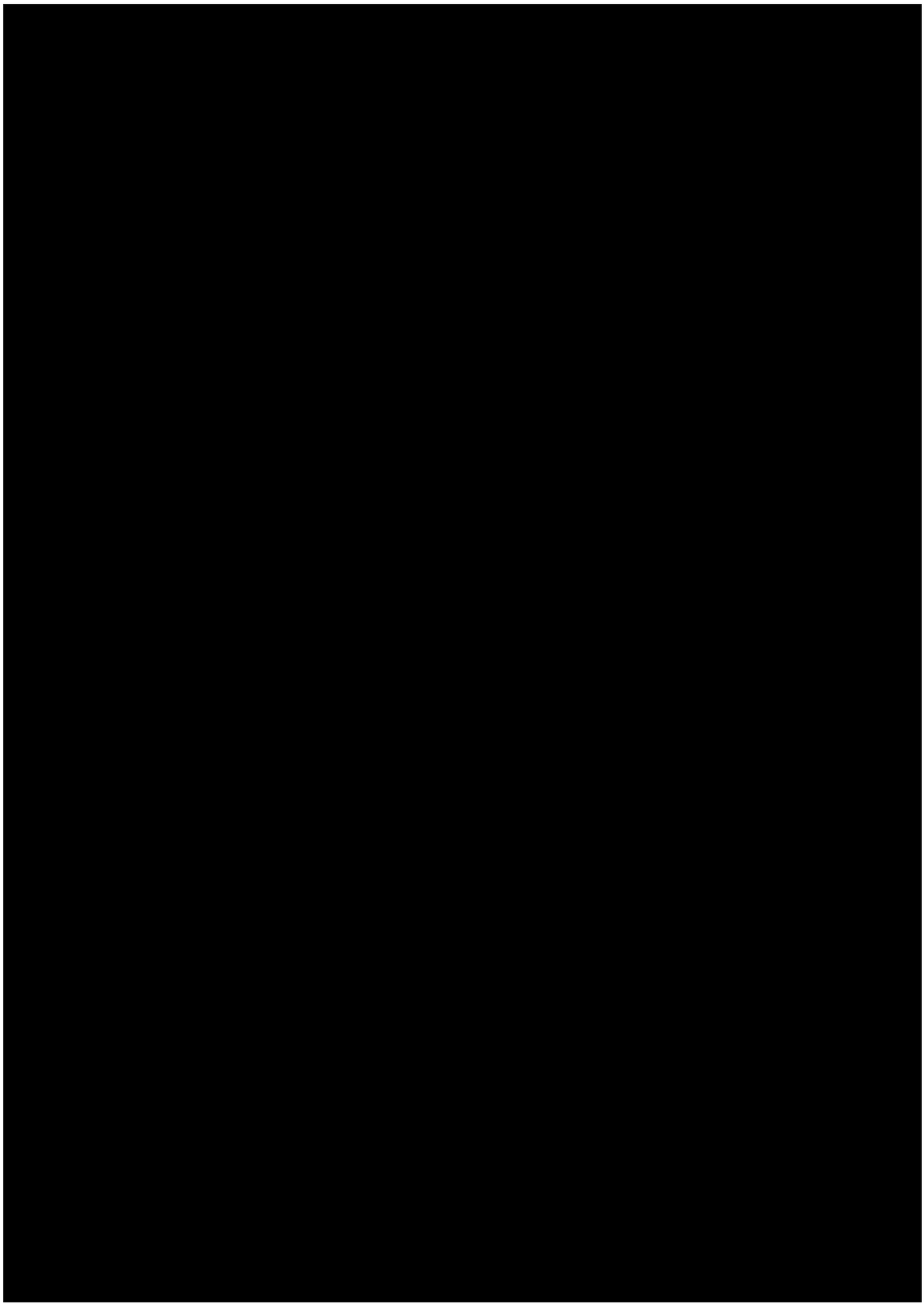
b. Các kiểu kỹ thuật RT - PCR

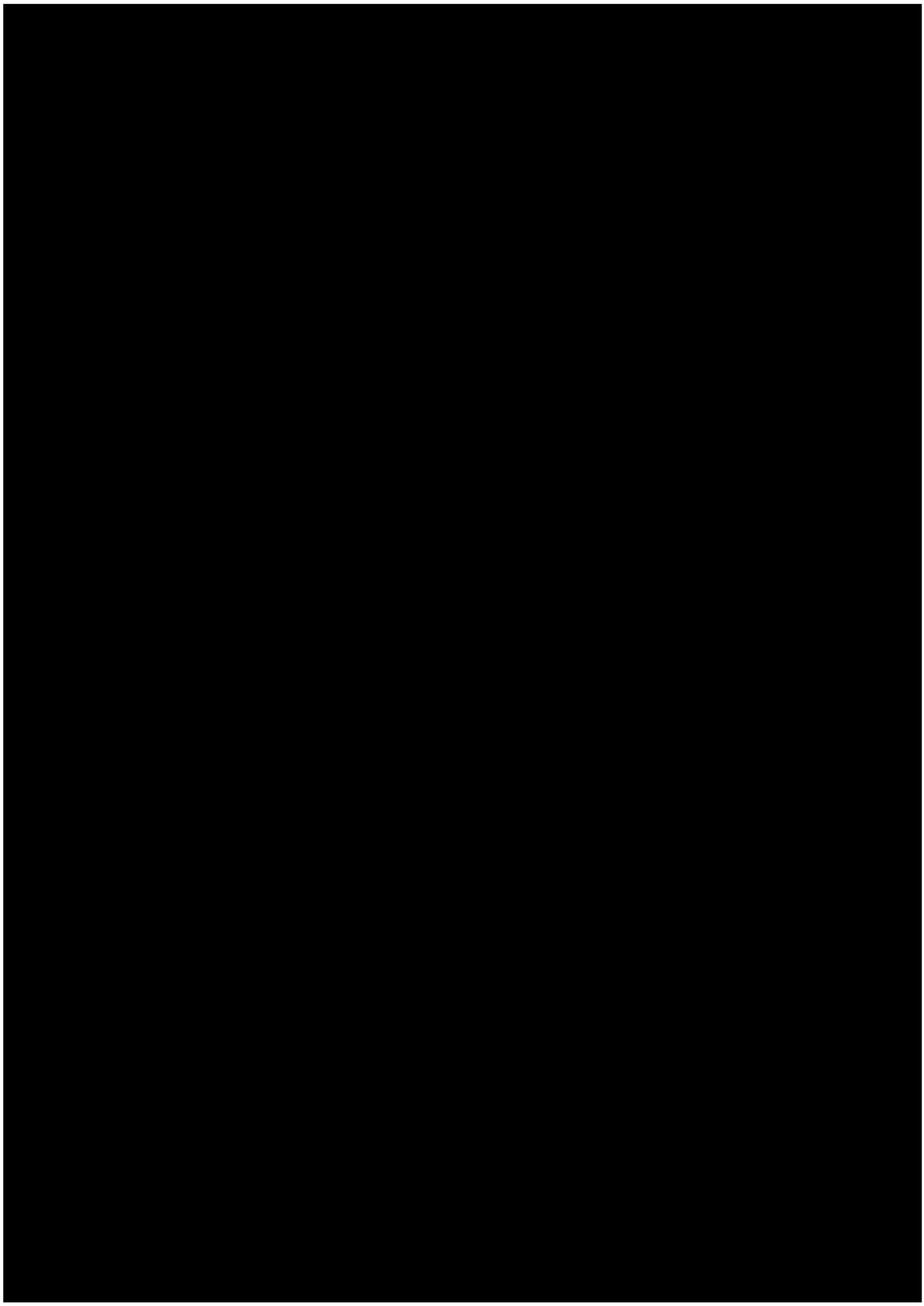
Hai giai đoạn của RT - PCR có thể được thực hiện đồng thời trong một phản ứng PCR (còn gọi là kỹ thuật one - step) hoặc trong hai phản ứng riêng biệt (còn gọi là kỹ thuật two - step).

- Kỹ thuật one - step: Các enzyme và thành phần tham gia phản ứng được bổ sung đồng thời khi thiết lập phản ứng. Kỹ thuật này đơn giản, hạn chế sai sót trong quá trình phản ứng và nhiễm mẫu, phù hợp với số lượng mẫu lớn. Tuy nhiên, vì điều kiện phản ứng phải phù hợp cho cả hai giai đoạn tổng hợp và khuếch đại cDNA, kỹ thuật one - step đôi khi có độ nhạy thấp và kém hiệu quả hơn;

- Kỹ thuật two - step: Phản ứng tổng hợp cDNA thực hiện trước, sau đó bổ sung DAN polymerase cho phản ứng khuếch đại DNA. Việc tách rời hai giai đoạn phản ứng giúp tối ưu hóa điều kiện của mỗi giai đoạn, linh hoạt hơn khi lựa chọn, điều chỉnh các thành phần phản ứng phù hợp với mục tiêu của thí nghiệm. Tuy nhiên, so với kỹ thuật one - step thì cần nhiều thời gian và thao tác hơn, do đó tăng nguy cơ nhiễm mẫu và những sai khác trong kết quả.

c. Ứng dụng





c. Ứng dụng

Real-time PCR là công cụ hữu ích với nhiều ứng dụng trong nghiên cứu và thực tiễn. Hai trường hợp ứng dụng điển hình:

- Phân tích định lượng trình tự mục tiêu trong các ứng dụng chẩn đoán y học;

- Phân tích mức độ biểu hiện của gene mục tiêu.

8.4.2. Các phương pháp lai phân tử

8.4.2.1. Nguyên lý chung của các phương pháp lai phân tử

Các phương pháp lai phân tử được thiết lập dựa trên sự bắt cặp của hai đoạn DNA/RNA sợi đơn có trình tự bổ sung ở trong điều kiện phản ứng thích hợp. Qua đó phát hiện sự tồn tại của một trong hai phân tử nhờ vào sự hình thành của thể lai. Các phương pháp lai sử dụng một đoạn DNA/RNA sợi đơn gọi là mẫu dò (probe), mẫu dò có trình tự bổ sung với trình tự mục tiêu. Các mẫu dò được đánh dấu bằng tín hiệu phóng xạ hoặc huỳnh quang, qua đó giúp phát hiện sự hình thành thể lai. Các phân tử DNA sợi đôi cần được biến tính để tạo sợi đơn trước khi thực hiện phản ứng lai trên một màng lai thích hợp. Các màng lai thường làm bằng vật liệu nylon hoặc nitrocellulose. Tuỳ thuộc vào tính chất của các phân tử acid nucleic và cách thức thực hiện phản ứng lai, các phương pháp lai khác nhau đã được phát triển cho nhiều ứng dụng thực tiễn.

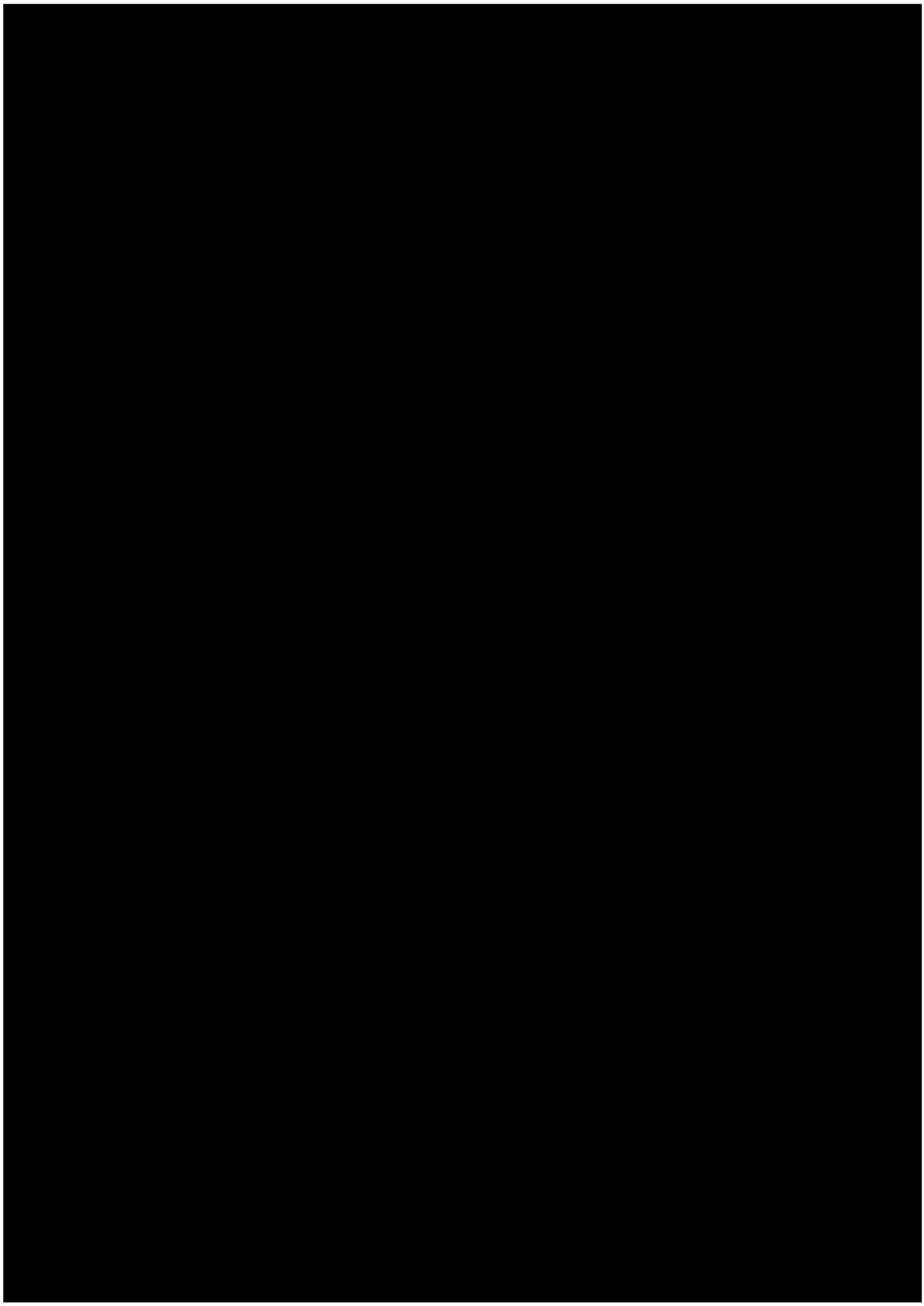
8.4.2.2. Lai Southern

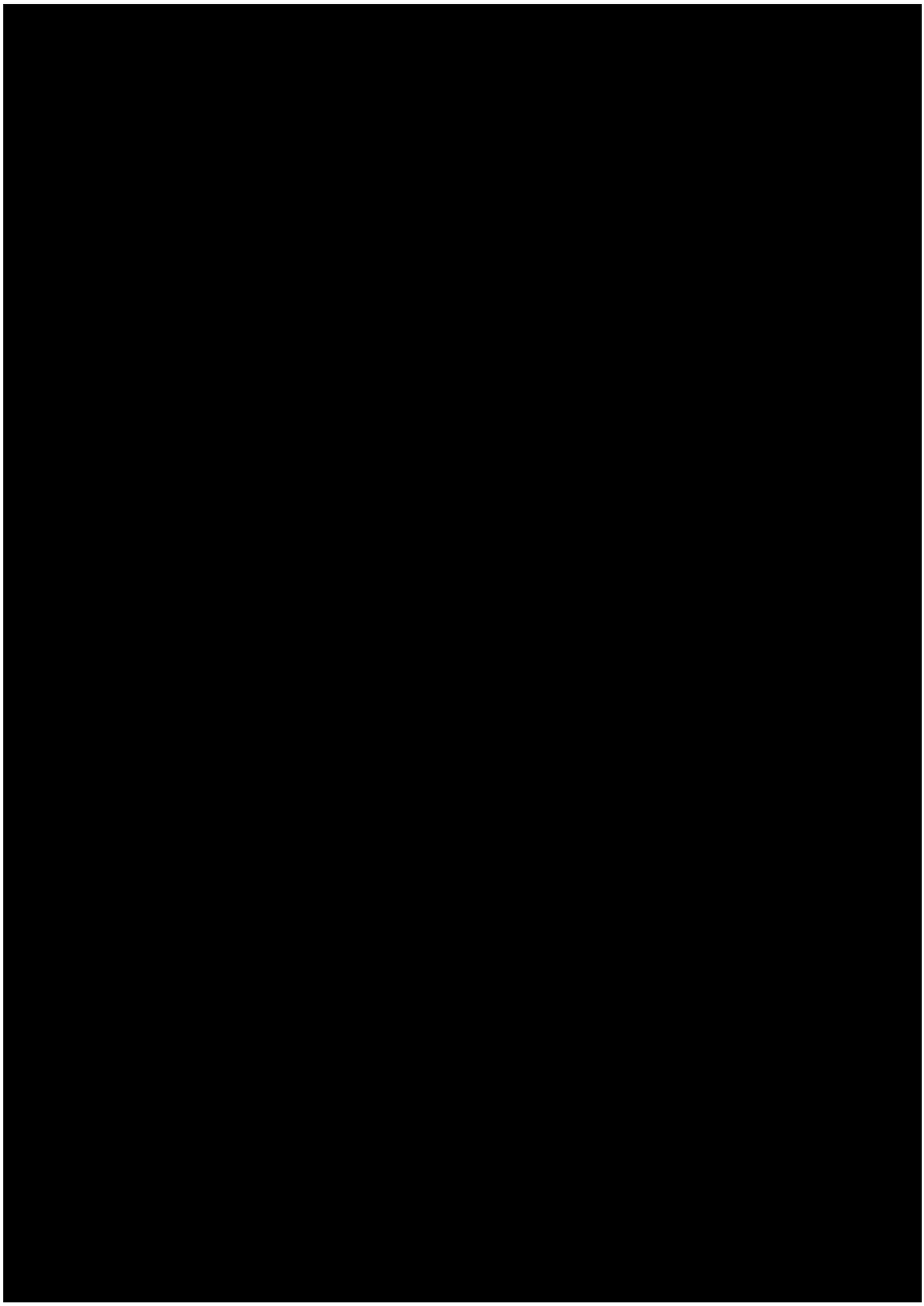
a. Nguyên lý

Lai Southern (Southern hybridization/blotting) là phương pháp được phát triển cho mục đích lai hai đoạn DNA. Trình tự DNA mục tiêu được dò tìm bằng một mẫu dò DNA có trình tự bổ sung.

b. Các bước của phương pháp lai

Giả sử ta có một phân tử DNA rất lớn (có thể là nhiễm sắc thể của loài A), và mục tiêu là xác định vị trí của một gene (đã được tìm thấy trước đó trên loài B) trên phân tử DNA đó. Trước tiên, hệ gene hoặc nhiễm sắc thể của loài A cần được cắt thành các đoạn nhỏ (bằng enzyme cắt giới hạn) sau đó tách ra bằng điện di gel agarose. Để xử lý các phân tử DNA sợi đôi thành sợi đơn, gel được ngâm vào một dung dịch có tính kiềm (ví





sắc thể, hoặc quan sát mức độ biểu hiện gene thông qua xác nhận sự hiện diện của mRNA tương ứng.

8.4.2.5. Lai khuẩn lạc

Lai khuẩn lạc là kỹ thuật dùng để chọn lọc dòng vi khuẩn mang gene quan tâm bằng cách sử dụng mẫu dò bổ sung với gene đó. Đầu tiên, các khuẩn lạc trên đĩa petri được chuyển sang một màng lai, sau đó xử lý để ly giải các tế bào vi khuẩn và biến tính DNA. Dưới tác dụng của nhiệt hoặc tia UV, các phân tử DNA được cố định trên màng lai bằng các liên kết cộng hóa trị. Tiếp theo, màng lai được ngâm vào dung dịch chứa các mẫu dò đã được đánh dấu để hình thành các phân tử lai với DNA trên màng. Các mẫu dò không bám hoặc bám không hoàn toàn được rửa trôi và màng lai được sử dụng để xác định các khuẩn lạc mang gene quan tâm.

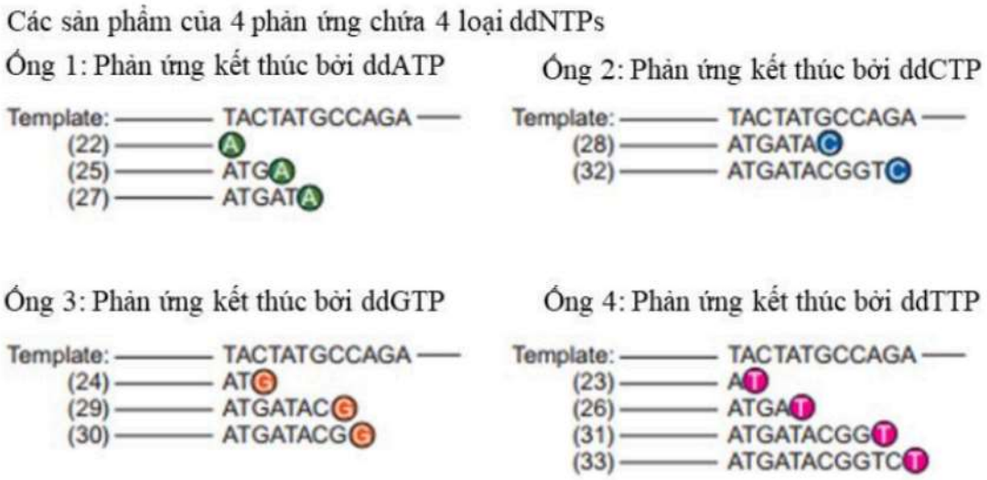
8.4.3. Các phương pháp giải trình tự DNA

8.4.3.1. Phương pháp dideoxy

a. Nguyên lý

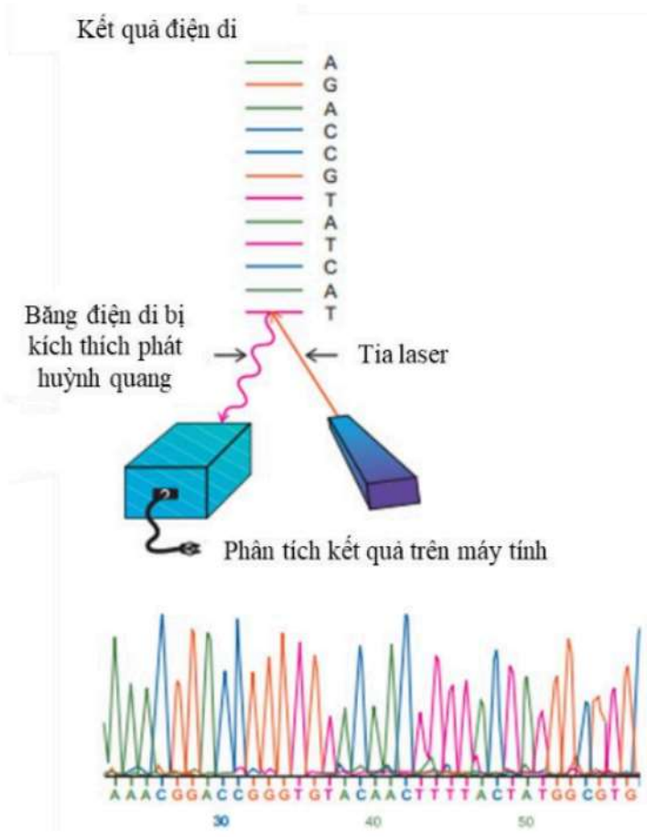
Phương pháp dideoxy, hay còn gọi là phương pháp Sanger, là phương pháp xác định trình tự DNA dựa sự kết thúc phản ứng tổng hợp chuỗi của DNA polymerase bởi các phân tử dideoxynucleotide (ddNTP) đã bị mất nhóm hydroxyl ở vị trí đầu 3’ của phân tử đường.

Nhóm 3’- OH cho phép gắn thêm một nucleotide mới vào chuỗi. Khi một ddNTP được thêm vào chuỗi, vì thiếu nhóm chức này nên nucleotide tiếp theo không được thêm vào, phản ứng tổng hợp sẽ dừng lại. Ngược lại, phản ứng kéo dài mạch ở vị trí 3’- OH vẫn tiếp tục nếu các deoxynucleotide (dNTP) được gắn vào. Trong một phản ứng chứa cả dNTP và ddNTP nên sau khi phản ứng tổng hợp kết thúc sẽ hình thành các đoạn DNA có độ dài khác nhau do ddNTP gắn ngẫu nhiên. Dựa vào sự sai khác về độ dài các đoạn DNA được hiển thị trên bản gel điện di để xác định trình tự DNA.

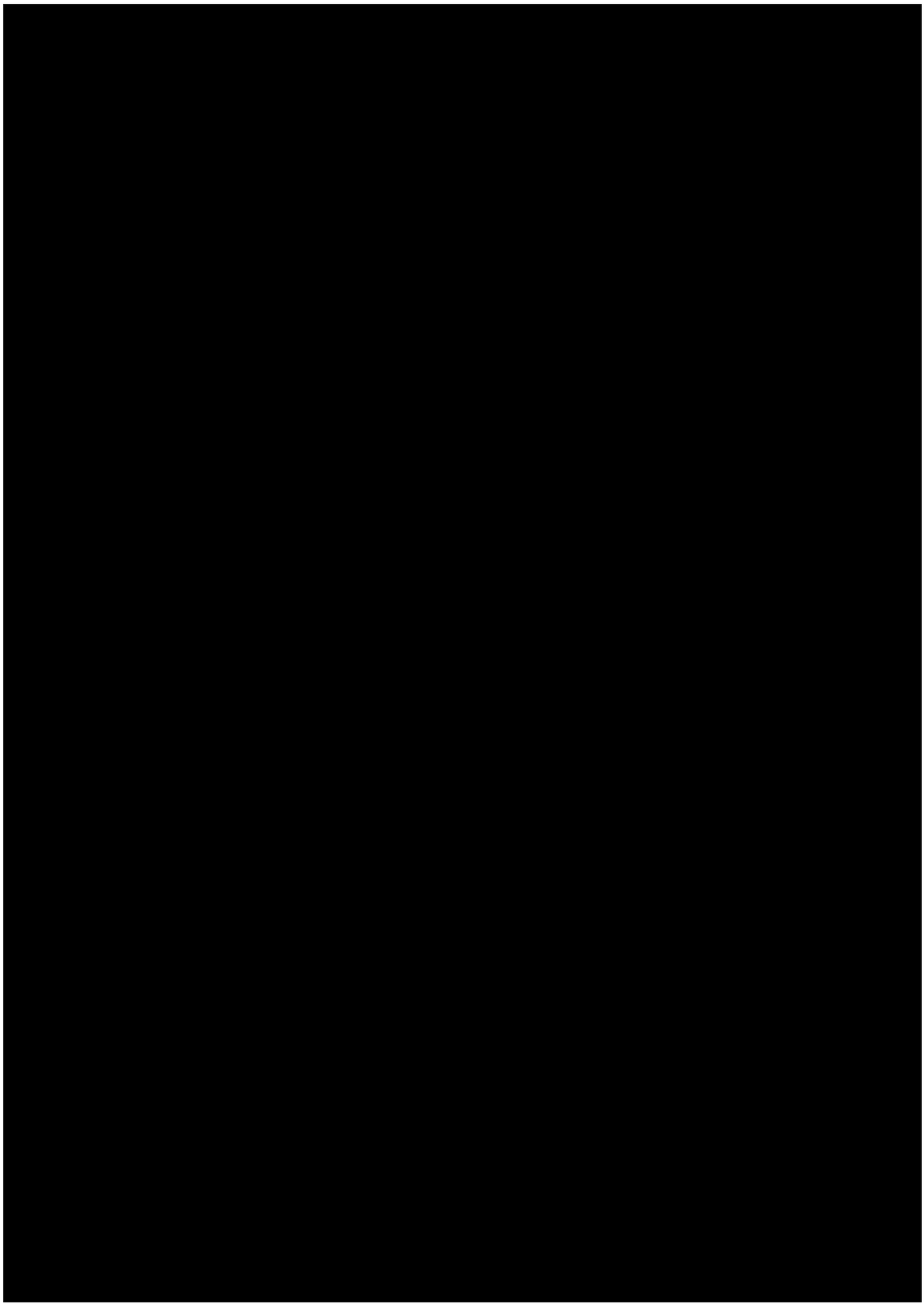


Hình 8.8. Các sản phẩm hình thành từ các phản ứng với các loại ddNTP khác nhau bằng phương pháp Sanger (Weaver, 2021)

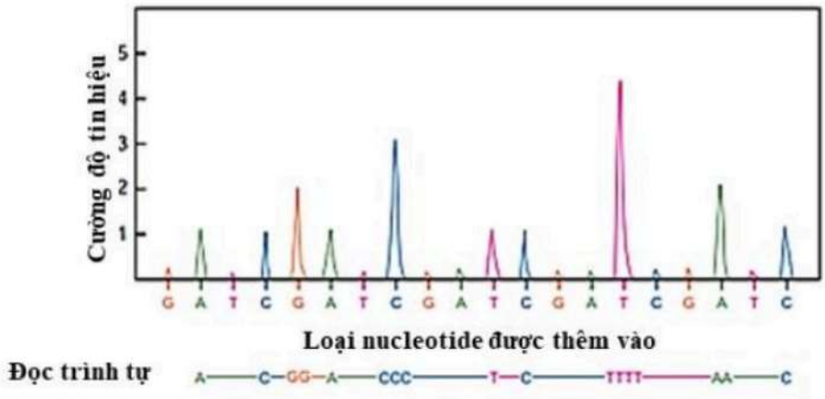
Chú thích: Đoạn mẫu DNA cần giải trình tự (template)



Hình 8.9. Minh hoạ quá trình đọc trình tự bằng phương pháp Sanger (Weaver, 2021)



phản ứng). Trong ví dụ minh họa ở **Hình 8.11,** khi thêm nucleotide G, phản ứng kéo dài mạch DNA không diễn ra, do đó không tạo ra PPi. Trên biểu đồ pyrogram lúc đó không xuất hiện đỉnh (hoặc một đỉnh thấp, có thể do vấn đề tạp nhiễm). Sau khi G được loại bỏ, nucleotide A được thêm vào, bổ sung với mạch DNA cần giải trình tự, dẫn đến phản ứng kéo dài mạch và tạo ra PPi. Kết quả phản ứng được ghi nhận bằng một đỉnh ở mức cường độ tín hiệu 1 và phản ứng được tiếp tục. Nếu có 2 nucleotide liên tiếp giống nhau được gắn vào mạch DNA, thì trên biểu đồ ghi nhận đỉnh ở cường độ tín hiệu ở mức cao hơn. Bằng cách này trình tự DNA được ghi nhận. Các bước thực hiện phản ứng tương tự như phương pháp dideoxy, chỉ khác ở thiết bị phân tích tín hiệu sử dụng.



Hình 8.11. Minh học biểu đồ phân tích trình tự pyrogram (Weaver, 2021)

Phương pháp pyrosequencing có ưu điểm là nhanh, chính xác và không cần sử dụng gel điện di. Tuy nhiên, điểm hạn chế của phương pháp là chỉ đọc được từng đoạn trình tự ngắn khoảng 200 - 300 nucleotide. Lý do là việc liên tục thêm các thành phần cần cho phản ứng kéo dài chuỗi khiến cho thành phần phản ứng bị pha loãng, trong khi các thành phần ức chế phản ứng lại tích tụ, hoặc do việc kéo dài chuỗi không đồng bộ gây khó khăn cho máy tính trong việc phân tích. Với kích thước đoạn trình tự ngắn, phương pháp pyrosequencing khó có thể áp dụng để giải trình tự một hệ gene mới bởi khó khăn trong việc lắp ráp các đoạn này thành một trình tự dài hoàn chỉnh.

CÂU HỎI ÔN TẬP

Câu 1: Hệ gene thực vật gồm những hệ gene thành phần nào ? Trình bày đặc điểm của các hệ gene đó ?

Câu 2: Trình bày chức năng của các thành phần cấu trúc của một gene ở thực vật ? Các thành phần đó có vai trò gì trong quá trình điều hòa biểu hiện của gene ?

Câu 3: Tiền mRNA và mRNA trưởng thành khác nhau như thế nào? Quá trình hình thành mRNA trưởng thành từ tiền mRNA gồm bao nhiêu bước và các bước này có liên quan thế nào tới việc biểu hiện của gene ?

Câu 4: Phân tích các mức độ trong hoạt động điều hoà biểu hiện gene ?

Câu 5: Trình bày nguyên tắc chung và ứng dụng của các phương pháp lai phân tử ?

Câu 6: Giải thích nguyên lý của phương pháp giải trình tự dideoxy ? Phân tích ưu nhược điểm của phương pháp này ?

Câu 7: Trình bày nguyên lí, ưu và nhược điểm của phương pháp giải trình tự pyrosequencing ?

CHƯƠNG 9

PHÂN LẬP VÀ TẠO DÒNG GENE

TÓM TẮT CHƯƠNG

Thực vật chuyển gene là các cá thể mang gene ngoại lai từ sinh vật khác và biểu hiện gene thành tính trạng tương ứng. Các gene mục tiêu chuyển vào tế bào thực vật có thể được phân lập từ các nguồn vật khác nhau bằng enzyme cắt giới hạn, PCR, hoặc tổng hợp cDNA. Để đảm bảo hiệu quả chuyển gene cũng như biểu hiện gene, trình tự mục tiêu cần được tạo dòng trong một thể mang (vector) để tạo ra một vector tái tổ hợp. Qúa trình tạo dòng gene bao gồm các bước: (1) chuẩn bị gene mục tiêu và vector, (2) gắn gene mục tiêu vào vector, và (3) biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào vật chủ để chọn lọc và nhân dòng. Nội dung chương này đề cập các nguyên lý, phương pháp và công cụ quan trọng được sử dụng để phân lập và tạo dòng thành công gene mục tiêu. Những kiến thức cung cấp giúp người học có thể hiểu rõ bản chất, cũng như có thể vận dụng để thiết kế một chiến lược tạo dòng gene theo một mục tiêu nào đó.

9.1. Thực vật chuyển gene

Hiện tượng vi khuẩn có khả năng biến nạp vật chất di truyền của chúng vào hệ gene thực vật và tính toàn năng của tế bào đã đặt nền tảng cho phát triển thực vật chuyển gene. Một cá thể được xem là thực vật chuyển gene khi chúng dung hợp và biểu hiện các gene mục tiêu để hình thành tính trạng mới. Sự biểu hiện của gene được xem là điều kiện quan trọng để xác định cây đã được chuyển gene thành công hay không. Thông qua các cách tiếp cận khác nhau, gene mục tiêu có thể được dung hợp vào shệ gene nhân, lục lạp, hoặc ti thể một cách ngẫu nhiên hay có chủ đích. Gene dung hợp vào hệ gene nhân có thể di truyền sang thế hệ tiếp theo bằng con đường sinh sản hữu tính. Trước khi biến nạp vào tế bào thực vật, gene mục tiêu cần được tạo dòng bằng công nghệ DNA tái tổ hợp (**Mục 9.2**).

9.2. Các bước cơ bản tạo thực vật chuyển gene

Một cây chuyển gene được tạo ra theo các bước trình tự sau (**Hình 9.1**):

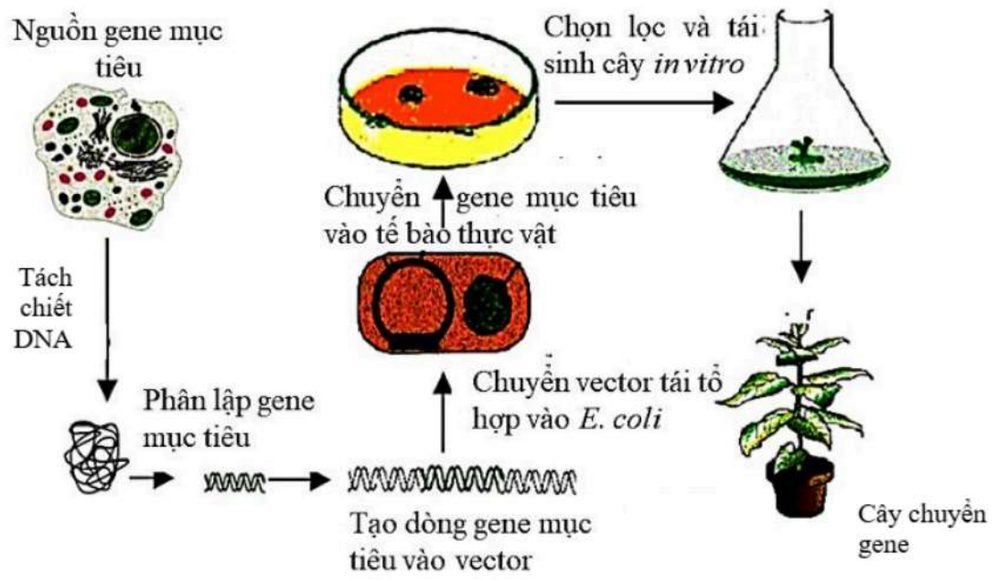
- *Phân lập gene*: Các gene mã hoá tính trạng quan tâm chuyển vào một đối tượng thực vật nào đó thường có nguồn gốc từ các đối tượng sinh vật khác khác. Gene mục tiêu tồn tại ở trong hệ gene của các loài sinh vật. Do đó, các đoạn DNA mang trình tự gene mục tiêu cần được phân lập từ các hệ gene của của chúng để phục vụ cho các thao tác tạo dòng (**Mục 9.3**). Do sự tương đồng về bản chất hoá học, các gene từ động vật, thực vật, vi sinh vật hoặc thậm chí cả gene tổng hợp đều có thể chuyển vào tế bào thực vật.

- *Tạo dòng gene (gene cloning)*: Gene mục tiêu cũng như các trình tự DNA cần thiết sẽ được gắn vào một thể mang (gọi là vector) thích hợp để tạo ra cấu trúc vector tái tổ hợp (**Mục 9.4**). Vector tái tổ hợp có thể được tiếp nhận và nhân dòng bởi tế bào vật chủ (thường là các tế bào vi khuẩn). Các trình tự DNA cần thiết như: các gene chỉ thị để theo dõi sự tồn tại và chọn lọc cá thể mang gene, các trình tự tăng cường sự biểu hiện cũng như thu nhận sản phẩm biểu hiện gene.

- *Biến nạp gene vào tế bào thực vật*: Toàn bộ vector tái tổ hợp hay một phần trình tự mang gene mục tiêu được biến nạp vào tế bào bằng bằng phương pháp chuyển gene thích hợp. Các phương pháp chuyển gen được chia thành 2 nhóm chính: chuyển gene gián tiếp nhờ vi sinh vật, và chuyển gene trực tiếp bằng các phương tiện kỹ thuật (**Chương 10**). Sau khi vào tế bào, gene mục tiêu sẽ dung hợp vào hệ gene của tế bào đích theo một phương thức tái tổ hợp tương đồng nào đó.

- *Chọn lọc tế bào mang gene ngoại lai và tái sinh cây*: Trong quần thể tế bào được biến nạp sẽ có những tế bào tiếp nhận gene mục tiêu, nhưng cũng có những tế bào không thực hiện quá trình này. Do đó, cần tiến hành chọn lọc các tế bào mang gene mục tiêu. Việc chọn lọc dựa vào sự có mặt hay biểu tính trạng do sự có mặt của gene mục tiêu hoặc các gene chỉ thị được tổ hợp ở trong vector.

- *Sàng lọc cá thể mang gene mục tiêu và đánh giá mức độ biểu hiện gene*: Đây là bước cần thiết để đánh giá hiệu quả của của quá trình chuyển gene. Các kỹ thuật nhuộm mô, phân tích acid nucleic và protein thường được sử dụng để sàng lọc và đánh giá mức độ biểu hiện gene.



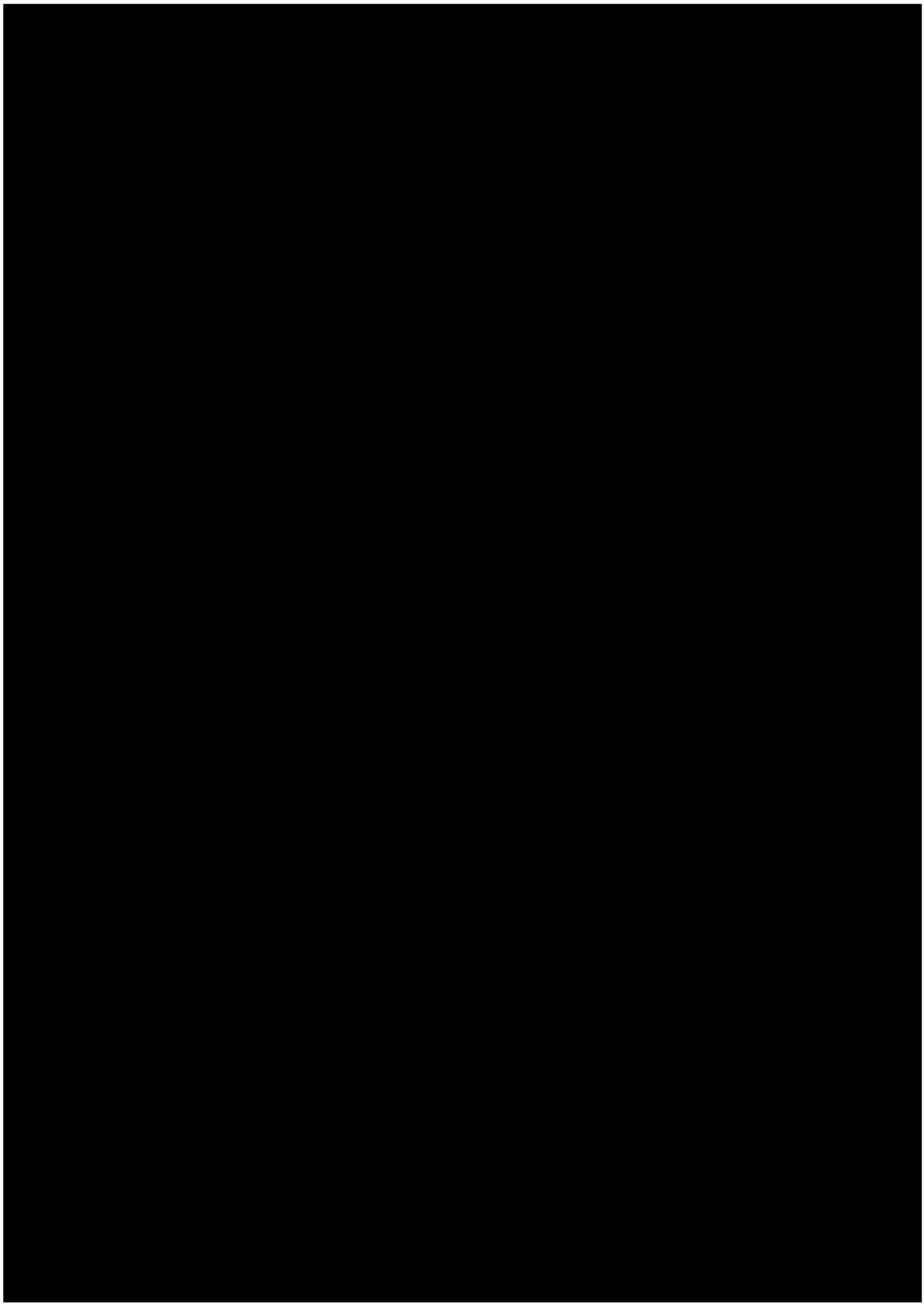
Hình 9.1. Quy trình tạo thực vật chuyển gen (Nguyễn Văn Đồng và cộng sự, 2010)

9.3. Phân lập gene

Vì hệ gene của các sinh vật có kích thước lớn nên để hạn chế sự đứt gãy và tạo thuận lợi cho tạo dòng gene, các đoạn DNA chứa trình tự gene cần được phân lập từ hệ gene của chúng. Các đoạn DNA này có thể được tạo ra bằng các cách khác nhau:

- *Một là, sử dụng các enzyme cắt giới hạn*. Kỹ thuật này sẽ hữu ích nếu có sự xuất hiện trình tự đặc hiệu của các enzyme cắt giới hạn ở gần hai đầu của gene mục tiêu, nhưng không xuất hiện trong vùng trình tự mã hoá gene. Các phân đoạn sau khi cắt được phân tách bằng kỹ thuật điện di gel và thu hồi sản phẩm bằng các phương pháp tinh sạch phù hợp. Nhược điểm của kỹ thuật này là hàm lượng sản phẩm tạo thành ít, đôi khi không đáp ứng đủ cho bước tạo dòng tiếp theo.

- *Hai là, sử dụng kỹ thuật PCR.* Thay vì phân tách và thu hồi các đoạn DNA mang gene mục tiêu, trình tự gene có thể được khuếch đại với số lượng lớn nhờ vào kỹ thuật PCR. Kỹ thuật này thường được áp dụng phổ biến, với điều kiện trình tự gene mục tiêu đã được biết rõ để tạo cơ sở cho việc thiết kế mồi. Ưu điểm của cách phân lập này là tạo ra đoạn DNA số lượng lớn và có thể thiết kế có chủ đích các vùng trình tự biên của gene mục tiêu.



bước chuyển gene vào tế bào thực vật. Đây chính là mục tiêu của tạo dòng gene, do đó một quá trình bao gồm các thao tác chỉnh sửa và lắp ráp các phân tử DNA từ các nguồn khác nhau. Quá trình tạo dòng có thể được thực hiện bằng các phương pháp tái tổ hợp khác nhau, tuỳ thuộc vào các kỹ thuật sử dụng để tạo ra vector tái tổ hợp.

9.4.1. Các phương pháp tạo dòng gene

9.4.1.1. Phương pháp cắt - ghép

a. Nguyên lý

Phương pháp cắt - ghép còn được gọi là phương pháp tạo dòng dựa vào enzyme cắt giới hạn vì enzyme này đóng vai trò quyết định, hay phương pháp tạo dòng truyền thống. Phương pháp này được sử dụng phổ biến trước đây trong tạo dòng gene. Cấu trúc vector plasmid tái tổ hợp đầu tiên có thể nhân dòng trong tế bào *E. coli* đã được tạo ra bởi Stanley Cohen và Herbert Boyer vào năm 1973. Về bản chất, vector tái tổ hợp mang gene mục tiêu được tạo ra nhờ vào kết hợp khéo léo enzyme cắt giới hạn và enzyme nối. Các enzyme cắt giới hạn đóng vai trò như "cây kéo", cắt trình tự DNA tại những vị trí đặc hiệu; trong khi đó, enzyme nối đóng vai trò như keo dán gắn kết các đầu cuối của DNA để tạo nên cấu trúc tái tổ hợp.

b. Enzyme cắt giới hạn

Giải thuyết về sự tồn tại của các enzyme cắt giới hạn trong tế bào vi khuẩn đã được Werner Arber đề xuất những năm 1960s thông qua hiện tượng "ức chế sự phát triển của bacteriophages trong tế bào vi khuẩn". Các enzyme được cho là có vai trò hạn chế khả năng sinh sản của bacteriophages trong tế bào vi khuẩn bằng cách phân hủy vật liệu di truyền của bacteriophages một cách đặc hiệu. Sau đó, giả thuyết này đã được Hamilton Smith và Dan Nathan chứng minh vào đầu những năm 1970s khi phân lập thành công enzyme cắt giới hạn đầu tiên từ vi khuẩn *Haemophilus influenzae* Rd. Các enzyme cắt giới hạn được chia thành 04 loại (types I, II, III) dựa vào phương thức cắt khác nhau. Trong đó loại II với đặc điểm cắt phân tử DNA ngay tại trình tự nhận biết của chúng được ứng dụng phổ biến hơn các loại còn lại. Một số tính chất quan trọng của các enzyme cắt giới hạn:

- *Tính đặc hiệu vị trí:* Hoạt động cắt chỉ xảy ra ở một vùng trình tự nhận biết đặc hiệu của enzyme (restriction site). Chiều dài của các vùng trình tự đặc hiệu gồm 4 - 8

nucleotide; trình tự có cấu trúc đối xứng nghịch đảo (palindrome), nghĩa là hai mạch của trình tự hoàn toàn giống nhau khi chúng được đọc theo chiều 5' đến 3'.

- *Cơ chế phản ứng và các kiểu cắt:* Các enzyme có chức năng xúc tác phản ứng thuỷ phân các liên kết phosphodiester giữa các nucleotide ở vị trí xác định ở cả hai mạch để tách rời các phân tử DNA. Có hai kiểu cắt: cắt đầu bằng (blunt end) và cắt đầu lệch/so le (sticky/cohensive ends). Ở kiểu cắt đầu bằng, các enzyme tạo vết cắt ngay chính giữa trình tự nhận biết đặc hiệu tạo ra hai đoạn DNA đầu bằng. Sau khi cắt, hai đầu không có khả năng tự kết hợp trở lại. Đối với kiểu cắt đầu lệch, enzyme cắt bên này và bên kia của tâm đối xứng để tạo ra hai đầu lệch nhau một vài bazơ. Trong trường hợp này, các đầu dính bổ sung có thể bị bắt cặp trở lại.

- *Điều kiện phản ứng:* Một phản ứng cắt thường diễn ra ở trong một dung dịch đệm thích hợp có chứa Mg^{2+} làm tăng hoạt động xúc tác, nhiệt độ ủ từ 25 - 37°C, thời gian phản ứng 1 - 2 giờ. Các enzyme sẽ bị ức chế với sự có mặt ở nồng độ cao của các chất ức chế trong hỗn hợp phản ứng.

c. Các bước tạo dòng

Quá trình tạo dòng bằng phương pháp cắt – ghép bao gồm 04 bước (**Hình 9.3**):

- **Bước 1:** Cắt và tinh sạch trình tự gene mục tiêu và vector

Cả đoạn DNA mang gene mục tiêu và vector đều được cắt bởi cùng một loại enzyme trong các phản ứng độc lập với nhau. Ở mỗi phản ứng sẽ thu được phân tử DNA mạch thẳng với hai đầu cuối đặc trưng được tạo ra bởi các enzyme cắt giới hạn. Hai đầu cuối có thể được cắt cùng một enzyme hoặc hai enzyme khác nhau. Chiến lược sử dụng 2 enzyme (hay còn gọi là tạo dòng định hướng) cắt kiểu đầu lệch thường sử dụng trong tạo dòng vì sự thuận lợi của phản ứng nối và hạn chế hiện tượng tự tái tổ hợp của hai đầu cuối sau khi cắt. Quyết định lựa chọn các enzyme phụ thuộc vào sự có mặt của các trình tự nhận biết đặc hiệu ở hai đầu trình tự vùng mã hoá của gene mục tiêu và trong vùng tạo dòng của vector.

Trong trường hợp tạo dòng bởi 2 enzyme cắt giới hạn thì cần chú ý tính tương thích trong điều kiện phản ứng của chúng để giảm thao tác thí nghiệm. Trình tự nhận biết của các enzyme được lựa chọn cho chiến lược tạo dòng cũng không nên nằm trong vùng mã hoá để tránh việc bị cắt bởi enzyme. Trước đây việc tạo dòng bằng phương

pháp cắt – ghép gặp nhiều khó khăn do số lượng enzyme hạn chế. Tuy nhiên, điều này đã trở nên dễ dàng hơn với sự hỗ trợ của kỹ thuật PCR. Thông qua PCR các trình tự nhận biết phù hợp với chiến lược tạo dòng có thể được bổ sung vào hai đầu của gene mục tiêu.

Hỗn hợp phản ứng sau khi xử lí bằng enzyme cắt giới hạn được điện di trên gel để phân tách và băng gel có chứa đoạn DNA có kích thước mong muốn được tinh sạch bằng một phương pháp thích hợp để thu hồi DNA.

- **Bước 2:** Gắn gene mục tiêu vào vector

Các enzyme nối DNA sẽ được sử dụng để tái tổ hợp gene mục tiêu và vector đã chuẩn bị ở Bước 1 theo chiều hướng có chủ đích. Hai loại enzyme nối: *E. coli* DNA ligase và T4 DNA ligase được sử dụng phổ biến trong phản ứng nối. Hiệu quả phản ứng nối phục thuộc lớn vào tỷ lệ số phân tử (molar) giữa gene mục tiêu và vector sử dụng và các điều kiện phản ứng.

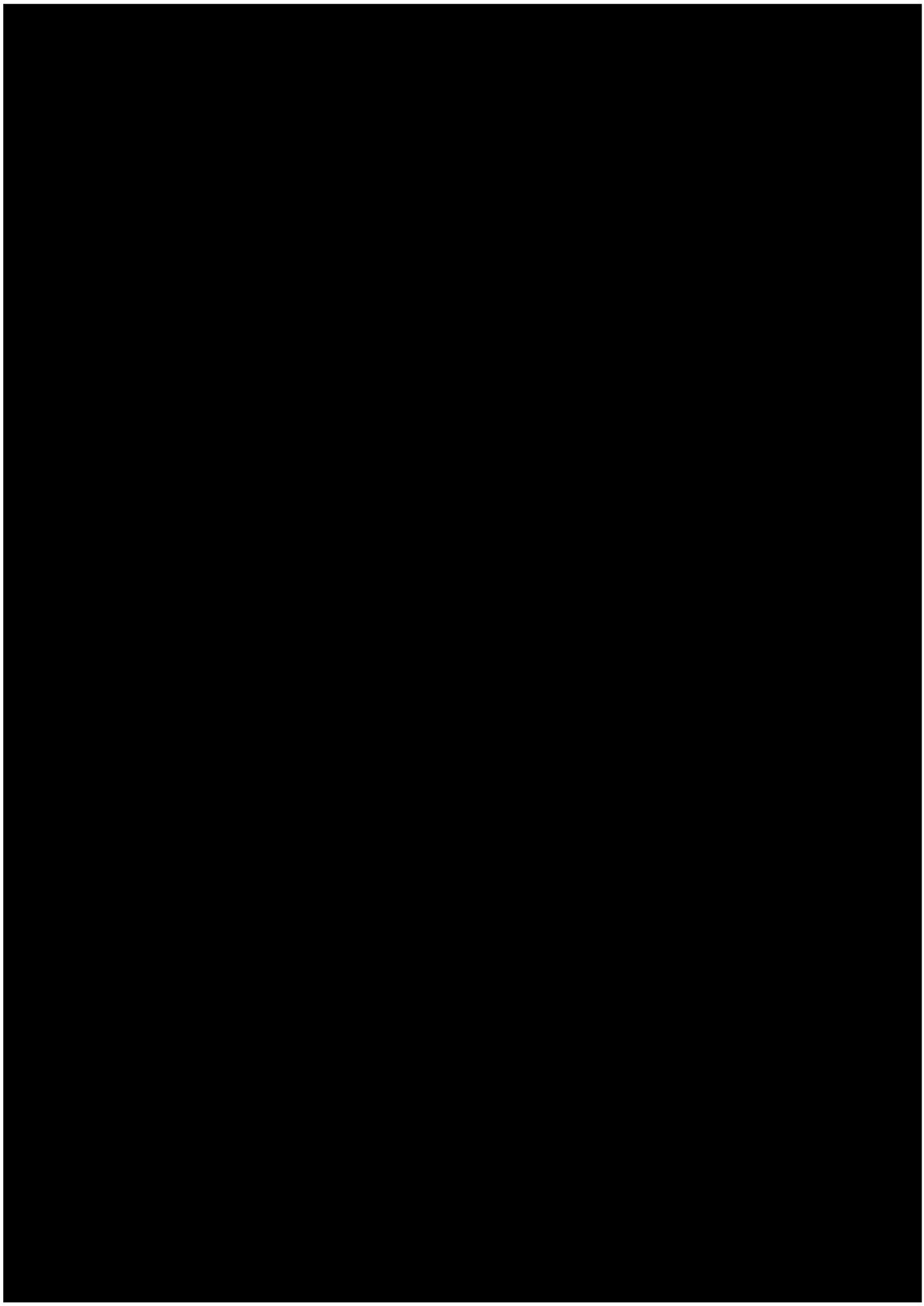
- **Bước 3:** Biến nạp vector tái tổ hợp và chọn lọc tế bào vật chủ mang gene

Vector tái tổ hợp hình thành (nếu có) sau phản ứng nối sẽ được biến nạp vào một tế bào vật chủ thích hợp, qua đó tiến hành chọn lọc các dòng tế bào mang gene chuyển. Các tế bào vi khuẩn, ví dụ như: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* và nấm men *Saccharomyces cerevisiae* thường hay được sử dụng làm tế bào vật chủ. Trường hợp các vector dựa vào virus là chiến lược được thiết kế cho chuyển gene thực vật thì các vector tái tổ hợp sẽ được đóng gói trong các thể virus của nó. Các phương pháp biến nạp khác nhau có thể được sử dụng để chuyển vector tái tổ hợp vào tế bào vật chủ, trong đó phương pháp hoá biến nạp bằng $CaCl_2$ và điện biến nạp được sử dụng phổ biến hơn cả vì sự thuận tiện và hiệu quả chuyển gene của chúng. Các tế bào sử dụng cho biến nạp phải là các tế bào khả biến (compentent cells). Sau khi biến nạp chúng được nuôi cấy trên môi trường có chứa tác nhân chọn lọc các dòng tế bào mang gene. Tác nhân sử dụng phụ thuộc vào các gene chỉ thị.

d. Ưu, nhược điểm

Ưu điểm:

- Thao tác dễ thực hiện, đơn giản, và các phương tiện sử dụng phổ biến;



9.4.1.2. Phương pháp tạo dòng topoisomerase

a. Nguyên lý

Phương pháp tạo dòng topoisomerase (TOPO cloning) dựa vào hoạt tính "cắt và nối" của enzyme topoisomerase 1. Enzyme này có khả năng bám vào và cắt vùng trình tự nhận biết (C/TCCTT) trên phân tử ADN sợi đôi. Năng lượng giải phóng ra từ quá trình này được dự trữ dưới dạng liên kết cộng hóa trị phosphotyrosyl giữa đầu 3' của DNA bị cắt và đuôi tyrosine của topoisomerase 1. Năng lượng liên kết này được enzyme sử dụng để xúc tác liên kết phosphodiester giữa đầu 3' với 5' của của đoạn DNA bị cắt ban đầu, từ đó giải phóng topoisomerase 1. Chính nhờ hoạt tính này topoisomerase đã được sử dụng trong tạo dòng mà không cần sử dụng enzyme cắt giới hạn và enzyme nối. Thực tế hiện nay, nhiều vector cơ bản dạng mạch thẳng (gọi là vector TOPO) có gắn topoisomerase 1 ở các đầu 3' đã được thương mại hoá. Điều này đã tạo điều kiện thuận lợi cho người sử dụng trong các thí nghiệm tạo dòng, chỉ cần thực hiện một phản ứng đơn giản để gắn các đoạn DNA mục tiêu vào vector.

b. Các kỹ thuật tạo dòng topoisomerase

- Kỹ thuật tạo dòng đầu bằng (blunt end TOPO cloning):

Các sản phẩm PCR đầu bằng hoặc đoạn DNA cắt giới hạn đầu bằng sẽ tái tổ hợp với vector dạng mạch thẳng với sự có mặt của topoisomerase 1 ở hai đầu cuối. Vì các sản phẩm PCR phải có các đầu cuối dạng đầu bằng nên phải sử dụng các enzyme DNA polymerase có hoạt tính exonuclease 3'-5' ví dụ như Pfu polymerase, trong phản ứng khuếch đại. Các đoạn DNA có thể tái tổ hợp với vector theo hai chiều khác nhau, tạo ra hai dạng cấu trúc tái tổ hợp mà trật tự trái ngược nhau (hay còn gọi là tạo dòng không định hướng). Do đó, sau khi biến nạp vào tế bào vật chủ cần phải tiến hành sàng lọc để có đượ dòng tế bào mang cấu trúc DNA tái tổ hợp mong muốn.

- Kỹ thuật tạo dòng đầu lồi TA (TA cloning):

Ở kỹ thuật tạo dòng này, vector TOPO chứa các đầu lồi với một nucleotide T. Các đầu lồi này sẽ liên kết bổ sung với các đầu lồi 3' mang nucleotide A ở sản phẩm PCR của gene mục tiêu do PCR của Taq DNA polymerase tạo ra. Tương tự vector TOPO tạo dòng đầu bằng, đây cũng là kiểu tạo dòng không định hướng. Tuy nhiên, các đầu lồi bổ sung T-A sẽ làm tăng hiệu quả tạo dòng rất nhiều so với kiểu tạo dòng đầu bằng.

- Kỹ thuật tạo dòng định hướng (Directional TOPO cloning):

Tạo ra cặp đầu lồi có trình tự bắt cặp bổ sung giữa vector TOPO và gene mục tiêu chính là cách tiếp cận để gắn gene mục tiêu vào vector theo chiều định hướng của kỹ thuật tạo dòng này. Gene mục tiêu được khuếch đại với mồi xuôi có chứa trình tự 5'-CACC, trong khi đó vector TOPO đã được tạo sẵn một đầu lồi mang trình tự 5'-GTGG, trình tự này thường ở đầu chứa vùng promoter trong các vector biểu hiện. Với hoạt động xúc tác của topoisomerase 1, đầu lồi 5'-CACC được tạo ra ở đầu 5' của trình tự gene mục tiêu để bắt cặp bổ sung với 5'-GTGG của vector và hình thành các liên kết giữa các nucleotide. Tương tự, hai đầu bằng còn lại của gene mục tiêu và vector cũng được gắn kết bởi sự xúc tác của enzyme (**Hình 9.4**).

Hình 9.4. Minh hoạ kỹ thuật tạo dòng định hướng với sự xúc tác của topoisomerase

Lợi thế của kỹ thuật này là có thể gắn gene mục tiêu theo một chiều xác định. Để phản ứng tạo dòng của topoisomerase 1 diễn ra thuận lợi thì sản phẩm PCR gene mục tiêu không chứa nucleotide A ở các đầu 3'. Vì vậy, các enzyme DNA polymerase có hoạt tính 3' - 5' exonuclease sẽ được sử dụng.

c. Các bước tạo dòng

- **Bước 1:** Khuếch đại đoạn DNA mang gene mục tiêu bằng kỹ thuật PCR

Một đoạn mồi thích hợp được thiết kế để khuếch đại gene mục tiêu. Tuỳ thuộc vào kiểu tạo dòng mà enzyme Taq polymease hay Pfu polymease được sử dụng. Sau khi phản ứng kết thúc, có thể chạy điện di để để kiểm tra sản phẩm khuếch đại. Đoạn DNA

được khuếch đại trong hỗn hợp phản ứng có thể được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo mà không cần tinh sạch.

- **Bước 2:** Thiết lập phản ứng tái tổ hợp

Trộn hỗn hợp sản phẩm của PCR với vector TOPO trong dung dịch đệm thích hợp cho hoạt động xúc tác của enzyme. Phản ứng tái tổ hợp vector và gene mục tiêu diễn ra khi ủ hỗn hợp ở nhiệt độ phòng, khoảng 5 phút. Sau khi thời gian ủ hỗn hợp phản ứng có thể được sử dụng ở bước tiếp biến nạp theo hoặc bảo quản ở điều kiện lạnh đông.

- **Bước 3:** Biến nạp vector tái tổ hợp và chọn lọc tế bào vật chủ mang gene

Bước này thực hiện tương tự như phương pháp cắt – ghép. Hỗn hợp chứa vector tái tổ hợp sau phản ứng được biến nạp vào tế bào vật chủ. Việc chọn lọc các dòng tế bào mang gene phụ thuộc vào các trình tự chức năng được thiết kế trên vector.

d. Ưu, nhược điểm

Ưu điểm:

- Thao tác thực hiện đơn giản, ít tốn thời gian.

- Có thể tạo dòng bất kì gene mục tiêu mà không bị hạn chế bởi đòi hỏi phải có các enzyme cắt giới hạn ở hai đầu.

Nhược điểm:

- Hầu hết các vector thương mại gắn liền với phương pháp tạo dòng này chủ yếu phục vụ cho mục đích nhân dòng tạo nguyên liệu cho bước tạo dòng tiếp theo (subcloning), các vector tạo dòng chuyên biệt dùng cho chuyển gene thực vật vẫn còn hạn chế;

- Hiện nay các kiểu tạo dòng đầu bằng và TA được sử dụng phổ biến, nhưng nhược điểm của các kĩ thuật này không thể chủ động tạo dòng định hướng;

- Mặc dù kỹ thuật tạo dòng định hướng có thể được sử dụng để gắn gene mục tiêu vào vector theo chiều mong muốn. Tuy nhiên, trong một số trường hợp việc thiết kế một mồi xuôi chứa trình tự 5'- CACC vẫn gặp phải khó khăn.

9.4.1.3. Phương pháp tái tổ hợp đặc hiệu vị trí

a. Nguyên lý

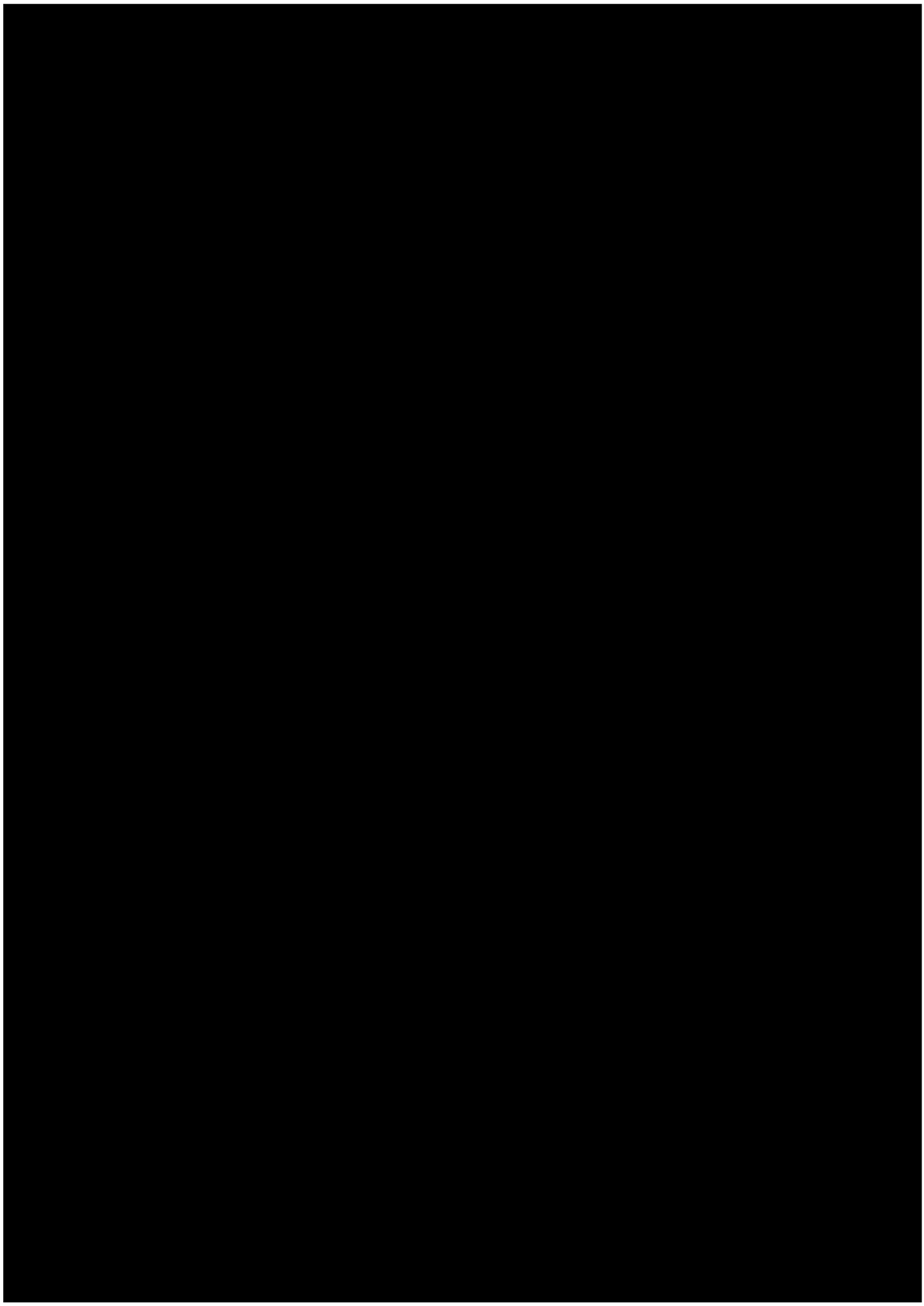
Phương pháp tạo dòng này được phát triển dựa vào cơ chế của hiện tượng tái tổ hợp đặc hiệu vị trí (site-specific recombination) diễn ra ở trong các quá trình của tế bào sinh vật như: sao chép (replication), dung hợp vật liệu di truyền của bacteriophages, hoặc chuyển dịch của các yếu tố di truyền di động (mobile genetic elements) trong genome (Aguilera và cộng sự, 2007). Các enzyme SSRs (site-specific recombinases) đóng vai trò quan trọng trong việc trao đổi giữa các đoạn DNA. Các enzyme SSRs nhận biết các vùng trình tự đặc hiệu (recombination sites) ở hai đầu các đoạn DNA tương đồng và tiến hành các hoạt động cắt, nối để trao đổi chéo (crossover) các trình tự đặc hiệu qua đó tái tổ hợp các đoạn DNA. Các vị trí nhận biết đặc hiệu có kích thước khoảng vài chục nucleotide với hai vùng trình tự (motif) đối xứng với cấu trúc lặp lại đảo ngược (inverted-repeat symmetry), ví dụ *attP* and *attB* của integrase từ bacteriophages λ.

Về nguyên lý chung, phương pháp tái tổ hợp đặc hiệu vị trí sử dụng kết hợp kỹ thuật PCR và tổ hợp các enzyme recombinase để tạo ra các vị trí nhận biết đặc hiệu tương đồng giữa gene mục tiêu và vector. Trong một số trường hợp, ngoài enzyme recombinase, hoạt động tái tổ hợp cần sự tham gia của các yếu tố bổ sung, ví dụ protein IHF (integration host factor) là cần cho phản ứng xúc tác của integrase. Trên thực tế, hiện nay các hệ thống tạo dòng tái tổ hợp đặc hiệu vị trí khác nhau đã được phát triển và thương mại hoá để phục vụ cho các mục đích tạo dòng. Hai kỹ thuật tái tổ hợp được sử dụng điển hình bao gồm: Gateway™ cloning (Invitrogene) và Creator™ (Clonetech).

- Gateway™ cloning:

Kỹ thuật tái tổ hợp này được phát triển dựa vào các enzyme (integrase và excisionase) tham gia vào chu kì xâm nhiễm và giải phóng của bacteriophage λ ở tế bào vi khuẩn. Hệ thống Gateway™ cloning bao gồm hai vector: vector nhận (pDonor) và vector đích (pDestination), mang các vị trí nhận biết đặc hiệu "*att*" khác nhau của enzymes, kết hợp với hai hỗn hợp enzyme tương ứng: hỗn hợp "BP clonase" chứa integrase và protein IHF và "LR clonase" chứa cả integrase, protein IHF và excisionase. Việc thiết kế các vùng trình tự *att* khác nhau ở hai đầu gene mục tiêu nhằm mục đích duy trì hướng của gene khi lắp ráp vào vector.

Quá trình tạo dòng bao gồm hai bước phản ứng (**Hình 9.5**). Đầu tiên, BP clonase xúc tác để gắn gene mục tiêu vào vector trung gian (pDonor) thông qua tái tổ hợp giữa



gene phải có chứa trình tự ở đầu 5' tương đồng (chiều dài khoảng 15 nucleotide) với trình tự có sẵn trên vector. Ở bước tiếp theo, trình tự gene mục tiêu được được chuyển từ vector tái tổ hợp master clone sang một vector biểu hiện (creator vector) hoặc một vector chứa *LoxP* một nhờ vào sự tái tổ hợp đặc hiệu vị trí giữa các trình tự *LoxP* của vector creator và vector master clone. Enzyme cre-recombinase đóng vai trò xúc tác cho phản ứng tái tổ hợp của *LoxP*.

b. Các bước tạo dòng

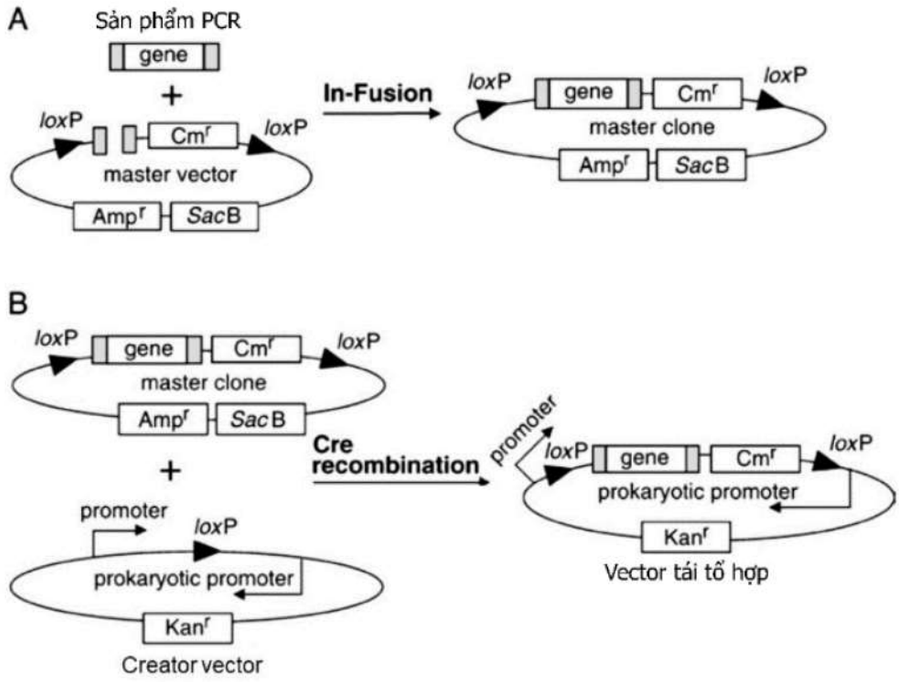
Một quy trình tạo dòng bằng kỹ thuật tái tổ hợp đặc hiệu vị trí thường bao gồm các bước sau:

- **Bước 1:** Khuếch đại gene mục tiêu bằng kỹ thuật PCR

Thực hiện PCR với một DNA polymerase có hoạt tính 3' - 5' exonuclease và các cặp mồi được thiết kế có chứa trình tự tương đồng ở các đầu 5'. PCR có thể được thực hiện lặp lại với cặp mồi thứ hai trong trường hợp cần tạo ra các trình tự đầu cuối tương đồng phù hợp. Các sản phẩm PCR cần được điện di và tinh sạch.

- **Bước 2:** Tạo vector tái tổ hợp trung gian

Một phản ứng được thiết lập với các thành phần phản ứng cần thiết: recombinase, đệm, sản phẩm PCR mang gene mục tiêu, vector nhận để gắn gene mục tiêu vào một vector nhận, qua đó tạo ra một vector tái tổ hợp trung gian. Hỗ hợp sau phản ứng được biến nạp vào một tế bào vật chủ để kiểm tra và chọn lọc khuẩn lạc tế bào mang vector mục tiêu nhờ vào các gene đánh dấu. Vector tái tổ hợp trung gian được tách chiết và tinh sạch để sủ dụng cho phản ứng ở bước tiếp theo



Hình 9.6. Các phản ứng tái tổ hợp đặc hiệu vị trí bằng hệ thống Creator™ cloning

- **Bước 3:** Tạo vector chuyển gene mang gene mục tiêu

Tương tự, một phản ứng được thiết lập để chuyển gene mục tiêu từ vector trung gian sang vector biểu hiện thông qua tái tổ hợp đặc hiệu vị trí att hoặc LoxP với sự xúc tác của recombinase. Thành phần phản ứng bao gồm: recombinase, đệm, vector chuyển gene (vector có sẵn hoặc người dùng tự thiết kế).

- **Bước 4:** Biến nạp vector tái tổ hợp và chọn lọc tế bào vật chủ mang gene

Hỗn hợp phản ứng chứa vector tái tổ hợp (Bước 3) được biến nạp vào tế bào vật chủ. Việc chọn lọc các dòng tế bào mang gene phụ thuộc vào các trình tự chức năng được thiết kế trên vector. Các chủng tế bào biến nạp thường được chọn lọc dựa trên sự kết hợp chọn khuẩn lạc kháng kháng sinh và độc tố do các gene đánh dấu quy định.

c. Ưu, nhược điểm

Ưu điểm:

- Các kỹ thuật tạo dòng tái tổ hợp hiện nay cho phép tạo dòng những trình tự gene mục tiêu, cassette mang gene có kích thước lớn;

- Nhiều gene có thể được tạo dòng cùng một lúc;

- Tính đặc hiệu và hiệu quả tái tổ hợp cao.

Nhược điểm:

Các chiến lược tạo dòng với mục đích biểu hiện cho mục đích đặc biệt vẫn còn gặp phải khó khăn do hạn chế của các loại vector thương mại.

9.4.2. Các trình tự cơ bản của vector chuyển gene thực vật

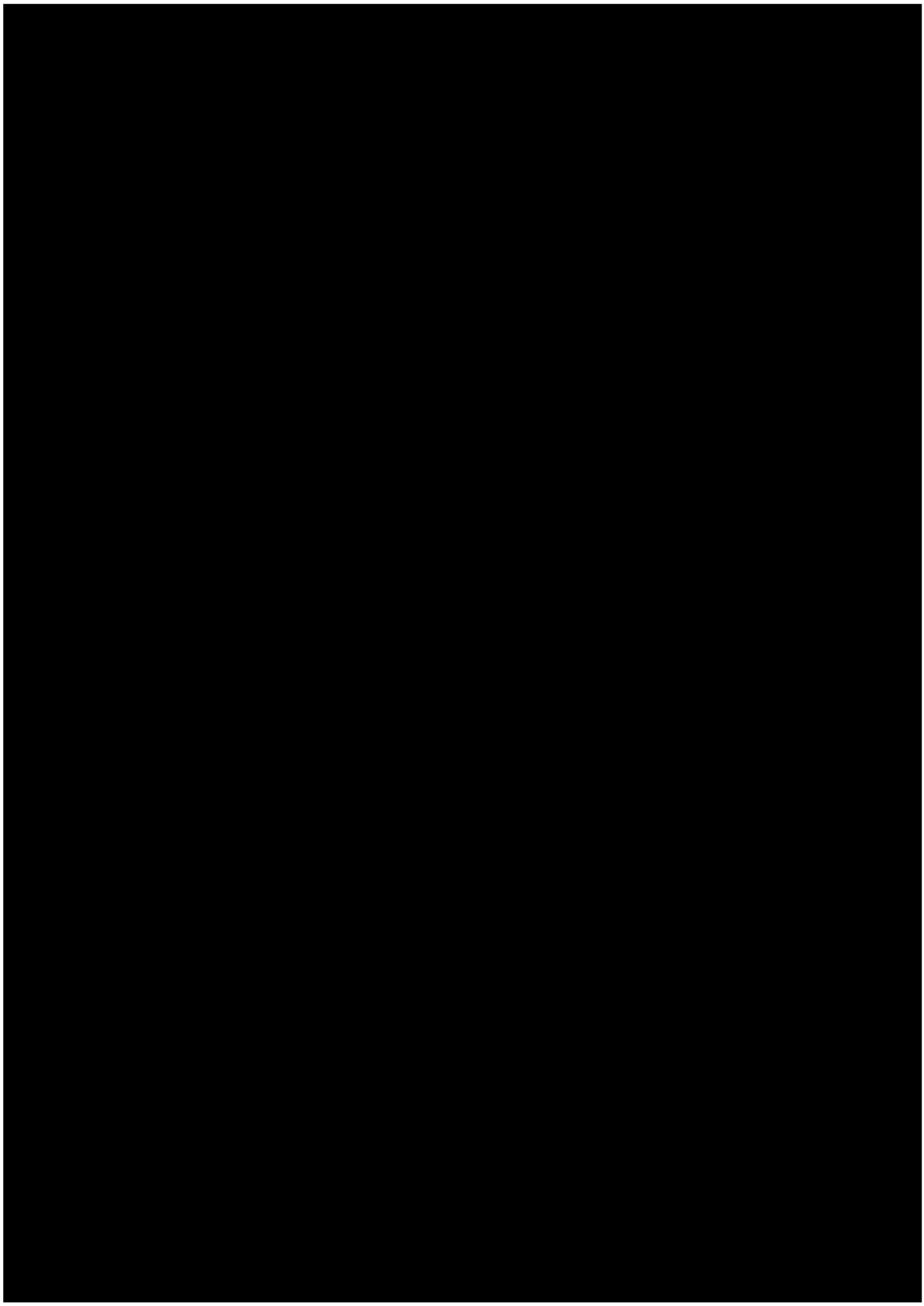
Vector chuyển gene thực vật là các phân tử DNA nhân tạo được sử dụng để tạo dòng gene mục tiêu và chuyển gene vào trong tế bào thực vật. Các vector có cấu trúc dạng vòng hoặc dạng sợi thẳng. Tuy nhiên, cấu trúc vector tái tổ hợp sau khi tạo dòng thường ở dạng vòng. Trong một số trường hợp, gene mục tiêu được cấu trúc dưới dạng một cassatte độc lập trước biến nạp mà không gắn vào vector. Khác với vector nhằm mục đích nhân dòng trong ứng dụng sinh học phân tử, các vector chuyển gene thực vật mang những vùng trình tự bổ sung để thực hiện các chức năng của chúng. Về cơ bản, các vector cần phải chứa các trình tự chức năng sau (**Hình 9.7**):

- *Khởi đầu sao chép (Ori):*

Ori là vùng nhận biết của hệ thống sao chép plasmid nội bào với một chuỗi trình tự giàu AT (AT - rich region). Sự có mặt của trình tự này là cần thiết cho sự tồn tại của vector trong tế bào vật chủ ở bước tạo dòng. Do đó, một trình tự ori tương hợp với nhiều tế bào vật chủ là cần thiết. Tuy nhiên, các trình tự như vậy, ví dụ RK2 trong vector pBIN19, thường cho phép sao chép plasmid với số bản sao thấp. Một cách tiếp cận khác là sử dụng các Ori khác nhau trên cùng một vector. Ví dụ: ColE1 và pUC đối với sự sao chép trong *E. coli*, pVS1 đối với sự sao chép trong *A. tumefaciens*.

- *Vị trí tạo dòng (multiple cloning site):*

Đây là vùng chứa các trình tự nhận biết đặc hiệu phục vụ cho việc gắn các gene mục tiêu vào vector. Các trình tự nhận biết của các enzyme cắt giới hạn hoặc tái tổ hợp tương đồng thường có mặt ở vùng này. Trong một số trường hợp, vùng trình tự tạo dòng cũng là vùng mã hoá cho một gene đánh dấu hỗ trợ cho việc chọn lọc tế bào/cá thể chuyển gene.



Bao gồm các trình tự giúp cho tổ hợp mang gene mục tiêu (gọi là cassette) có thể được dung hợp vào hệ gene thực vật, ví dụ các vector chuyển gene dựa vào hệ thống Agrobacterium thường chứa các vùng trình tự biên ở hai đầu T - DNA.

- *Các vùng trình tự chức năng khác:*

Một số trình tự ngắn có liên quan đến hoạt động biểu hiện gene cũng như tinh sạch protein có thể được thiết kế sẵn trên vector hoặc đính kèm cùng với trình tự của gene mục tiêu khi thiết kế, ví dụ: trình tự Kozak, 6xHis-tag,…

Giá trị của các vector chuyển gene ở tính linh hoạt và tiện dụng. Không có một vector nào là toàn năng dùng cho toàn bộ các mục đích, mà cần phải lựa chọn phù hợp cho từng trường hợp. Do tính chất quan trọng và nhiều ứng dụng nên các vector chuyển gene ngày càng được khám phá, hoàn thiện không ngừng.

9.4.3. Các loại vector chuyển gene thực vật

Từ những vector chuyển gene sẵn có trong tự nhiên như plasmid ở vi khuẩn, ngày nay người ta đã tạo ra nhiều loại vector khác nhau. Tuy nhiên, các vector dựa trên nền tảng Ti plasmid và virus vẫn được sử dụng phổ biến. Ngoài việc tự thiết kế vector cho một mục đích nghiên cứu đặc biệt, các phòng thí nghiệm có thể sử dụng các vector được thương mại hoá.

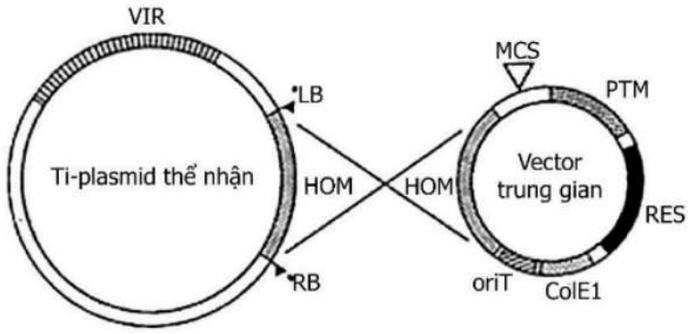
9.4.3.1. Vector dựa vào Ti plasmid

Từ khi khám phá khả năng dung hợp của vùng T - DNA trên Ti plasmid của vi khuẩn *A. tumefaciens* vào hệ gene nhân thực vật, các hệ thống vector dựa vào Ti plasmid đã được phát triển. Hệ thống vector Ti plasmid đã trở thành một công cụ quan trọng ứng dụng trong công nghệ gene thực vật. Kích thước của các vector Ti plasmid nguyên bản dao động từ 200 - 800 Kb. Cấu trúc của nó chia thành 3 vùng trình tự chính: vùng T-DNA, vùng gene *vir*, và vùng chuyển hoá opine. Ở vùng T - DNA, các trình tự gene cảm ứng nốt sần (*onc*) ở plasmid nguyên bản được thay thế bởi các vị trí tạo dòng và gene chỉ thị, và có các trình tự lặp lại bao ở hai đầu gọi là vùng biên trái (LB) và vùng biên phải (RB) (**Hình 9.7**). Vùng gene *vir* mã hoá cho các yếu tố tham gia hỗ trợ chuyển đoạn T - DNA vào tế bào, trong khi vùng chuyển hoá opine bao gồm các gene tham gia chuỗi chuyển hoá opine. Ngoài ra, vector Ti plasmid nguyên bản có kích thước lớn, do đó dẫn đến những hạn chế khi thao tác và số lượng bản sao thấp. Vì vậy, hai hệ thống

vector Ti plasmid cải tiến: liên hợp (cointegrative vector) và nhị thể (binary vector) đã được phát triển để khắc phục các hạn chế của vector nguyên bản.

9.4.3.2. Hệ thống vector liên hợp

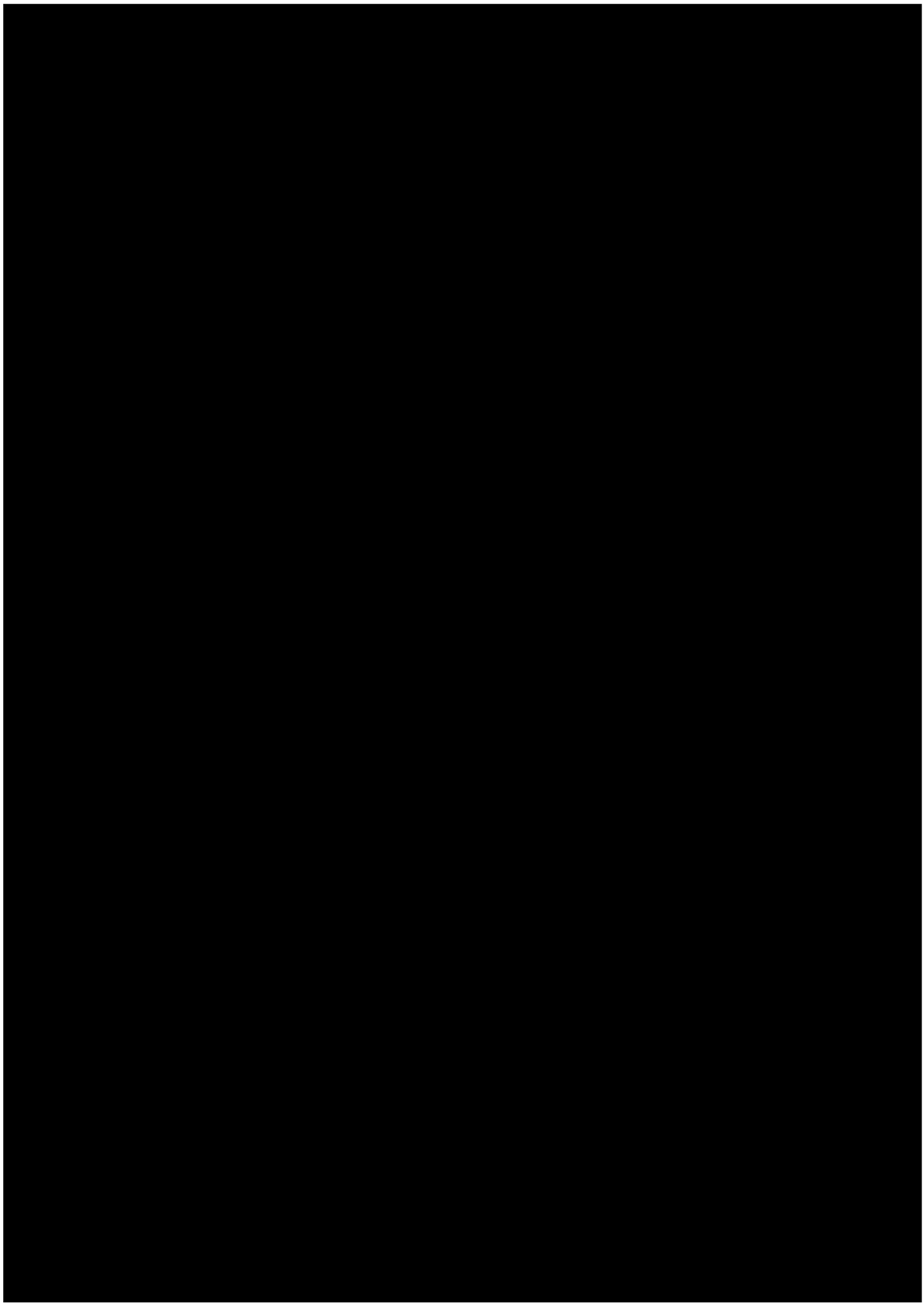
Hệ thống vector liên hợp bao gồm hai vector thành phần: vector trung gian (intermediate vector) và vector thể nhận (disarmed vector) (**Hình 9.8**). Vector thể nhận có nguồn gốc từ Ti plasmid nhưng vùng gene *onc* trên T - DNA đã được loại bỏ và thay thế bằng một đoạn DNA đặc hiệu tương đồng với vector trung gian. Vector trung gian là các vector tạo dòng kích thước nhỏ, thường sử dụng trong kỹ thuật tạo dòng phân tử. Ngoài trình tự tương đồng với vector thể nhận, vector trung gian còn mang T - DNA có chứa vùng tạo dòng và các trình tự chức năng cần thiết khác. Khi vi khuẩn *E. coli* mang vector trung gian tiếp hợp với *A. tumefaciens* mang vector thể nhận thì quá trình tái tổ hợp tương đồng sẽ diễn ra. Qua đó, toàn bộ vùng trình tự của vector trung gian được tái tổ hợp với vector thể nhận để tạo thành một cấu trúc vector liên hợp hoàn chỉnh. pGV3850 là một ví dụ điển hình về hệ thống vector liên hợp (Zambryski, 1983). Quá trình tiếp hợp để vận chuyển vector trung gian vào *A. tumefaciens* có sự hỗ trợ của các vector mang các gene *tra* và *mob* ở vi khuẩn *E. coli.* Sau khi tiếp hợp, vi khuẩn *A. tumefaciens* có thể đồng nuôi cấy để chuyển T - DNA mang gene mục tiêu vào tế bào thực vật. Trước đây, vector liên hợp đã được sử dụng phổ biến, tuy nhiên gần đây vector nhị thể được sử dụng phổ biến hơn.



Hình 9.9. Hệ thống vector liên hợp (Trần Quốc Dung và cộng sự, 2006)

Chú thích: VIR: vùng gene gây độc; HOM: các vùng tương đồng trong đó sự tái bản có thể xảy ra đối với sự liên hợp; LB: biên trái; RB: biên phải; MCS (multicloning site): các trình tự tạo dòng; PTM: marker biển nạp thực vật; RES: marker kháng kháng sinh; oriT, ColE1: các điểm khởi đầu sao chép

9.4.3.3. Hệ thống vector nhị thể



sửa và cải tiến theo hướng: loại bỏ những trình tự không cần thiết, bổ sung các trình tự cơ bản của một vector. Các vector virus có thể tồn tại ở dạng hệ gene, replicon (một trình tự RNA/DNA chứa điểm khởi đầu sao chép và có thể sao chép độc lập với các yếu tố di truyền khác), thậm chí là bao gồm trong một T - DNA. Hệ thống di truyền của các loài virus RNA được sử dụng phổ biến như: virus khảm súp lơ (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV), virus khảm thuốc lá (*Tobacco mosaic virus,* TMV), virus khảm cỏ linh lăng (*Alfafa mosaic virus*, AMV), virus khoai tây (*Potato virus X* (PVX), và virus khảm đậu đũa (*Cowpea mosaic* virus, CPMV); trong khi virus DNA được ứng dụng là virus *Bean yellow dwarf* (BeYDV).

Ưu điểm của vector virus là hiệu quả biến nạp và biểu hiện gene cao vì số lượng bản sao của gene lớn; linh hoạt trong tạo dòng, có thể ứng dụng nhiều hệ thống vector trên một cá thể và phạm vi vật chủ rộng. Tuy nhiên, hạn chế của các hệ thống vector này là: phần lớn trường hợp dùng cho mục đích biểu hiện tạm thời; gene chuyển không di truyền ở thế hệ tiếp theo; các ảnh hưởng của vector đến tế bào thực vật cũng như tương tác giữa các vector vẫn còn tồn tại.

Bằng các kỹ thuật di truyền, hệ thống di truyền của virus hoang dại đã được chỉnh sửa để trở thành một vector chuyển gene với 2 hình thức:

- Một là, vector được thiết kế có khả năng mang gene mục tiêu và chuyển gene vào tế bào theo con đường lây nhiễm theo phương thức tự nhiên của virus. Điều này có nghĩa là những đặc tính truyền nhiễm của virus vẫn giữ nguyên, bên cạnh việc bổ sung gene mục tiêu hoặc các trình tự chức năng cần thiết khác. Dạng vector này hay áp dụng cho trường hợp sản xuất một protein nào đó bằng con đường thực vật vì hiệu quả chuyển gene và biểu hiện cao, thời thao tác gian ngắn. Tuy nhiên, hạn chế là chỉ biểu hiện tạm thời ngoài nhân và rủi ro lây nhiễm không kiểm soát sang đối tượng khác;

- Hai là, phát triển vector dạng thoái cấu trúc (deconstruct virus vector). Ở dạng vector này, các trình tự cần thiết cho cho việc sao chép và lây nhiễm tế bào - tế bào của virus kết hợp với các trình tự ngoại lai được tạo dòng trong T - DNA của Ti plasmid. Quá trình phân phối T - DNA được thực hiện nhờ vi khuẩn thông qua kỹ thuật lây nhiễm *Agrobacterium* (Agroinfection). Trình tự gene mục tiêu có thể đươc biểu hiện ngay ở tế bào chất hoặc dung hợp vào genome (ít xảy ra).

9.4.4. Promoter

Promoter là một thành phần quan có vai trò quyết định đối với mức độ biểu hiện của gene vì nó điều khiển quá trình khởi đầu phiên mã. Trước những đòi hỏi của công nghệ gene, nhiều nghiên cứu đã phân lập và phát triển các hệ thống promoter từ các nguồn sinh vật khác nhau, trong đó cách tiếp cận là dựa vào đặc tính của gene được điều khiển bởi promoter đó. Trong chuyển gene thực vật, các gene mục tiêu, kể cả gene chỉ thị, cần được cấu trúc với một promoter thích hợp ứng với mục đích chuyển gene. Các promoter được sử dụng cho mục đích chuyển gene phải tránh hiện tượng bất hoạt trong tế bào vật chủ do ảnh hưởng tương tác giữa các promoter trên vector hoặc promoter của hệ gene thực vật với các trình tự tại vị trí dung hợp. Các promoter thực vật được chia thành 03 loại:

9.4.4.1. Promoter cơ định

Promoter cơ định (constitutive promoter) tham gia điều khiển biểu hiện gene ở tất cả hoặc hầu như các loại mô khác nhau trong tất cả hay hầu như mọi giai đoạn phát triển của sinh vật. Các gene điều khiển bởi loại promoter này có mức độ biểu hiện cao. Vì vậy, các promoter cơ định được sử dụng để tăng cường mức độ biểu hiện cho mục đích nghiên cứu chức năng gene hoặc tạo ra cây chuyển gene có tính trạng ưu việt.

Hai promoter được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu là promoter của gene *35S* (CaMV35S) từ virus khảm súp lơ (*Cauliflower mosaic virus* - CaMV) và promoter của gene *nopaline synthase* (NOS) từ Ti plasmid của *A. tumefaciens*. Mặc dù có nguồn gốc từ vi sinh vật nhưng cả CaMV35S và Nos đều cho thấy tương thích và hoạt dộng mạnh trong điều khiển biểu hiện gene ở thực vật. Các loại promoter này có thể hoạt động hiệu quả trong cây hai lá mầm, tuy nhiên ít hiệu quả hơn trong cây một lá mầm. Thay vào đó, promoter điều khiển gene *ubiqutin* (Ubq-1) từ cây ngô được đánh giá là hoạt động có hiệu quả ở cây một lá mầm. Ngoài ra, một số promoter cơ định có tiềm năng hoạt động mạnh khác cũng được phân từ các loài thực vật khác như: promoter của gene *actin* ở lúa có, promoter của gene ubiquitin của cỏ switchgrass,… Bên cạnh các promoter hoạt động trong nhân, các promoter tương thích với lục lạp cũng đã được phát triển, ví dụ các promoter ribosomal RNA operon (Prrn) (Sab và Maliga, 1993).

9.4.4.2. Promoter đặc hiệu

Promoter đặc hiệu (specific promoter) điều khiển sự biểu hiện của gene giới hạn ở một cơ quan, mô, hoặc tế bào, hoặc ở tại một thời điểm hay giai đoạn phát triển nào đó. *Giới hạn* ở đây được hiểu là chỉ biểu hiện hoặc biểu hiện vượt trội. Các promoter đặc hiệu hay được sử dụng khi cần sự biểu hiện của gene mục tiêu tại một vị trí hay thời điểm để đạt đươc một mục đích chuyển gene nào đó, hoặc hạn chế ảnh hưởng không đáng có khi nghiên cứu chức năng gene. Các promoter đặc hiệu điều khiển biểu hiện đặc hiệu ở rễ, hoa, củ, bó mạch, hoặc thời gian ngày/đêm đã được phân lập, nghiên cứu và ứng dụng trong công nghệ gene thực vật. Ví dụ, trường hợp các promoter điều khiển gene sucrose synthase (Rsuc1, Rsuc2, Rsuc3), Rsuc2 không có tính đặc hiệu mô cao, trong khi Rsuc3 biểu hiện ở hạt và Rsuc1 biểu hiện đặc hiệu ở bó mạch, rễ, mầm (Huang và cộng sự, 1996).

9.4.4.3. Promoter cảm ứng

Promoter cảm ứng (inducible promoter) chỉ hoạt động khi có mặt các yếu tố cảm ứng (inducer). Điều này được ứng dụng để điều khiển biểu hiện gene tại những thời điểm mong muốn, mà không tạo ra các ảnh hưởng khác. Hoạt động của promoter có thể được cảm ứng bởi các hoá chất hoặc các yếu tố môi trường như ánh sáng, nhiệt độ. Trong đó, các promoter được cảm ứng bởi các hoá chất, mà xuất hiện ở đối tượng thực vật nghiên cứu, thường được quan tâm như: hệ thống promoter được cảm ứng bởi tetracyline, steroids hoặc ethanol. Cơ chế chung của cảm ứng là các chất cảm ứng sẽ tương tác với các chất nhận (receptor), qua đó gải phóng trình trạng ức chế của promoter để gene được biểu hiện (Anami và cộng sự, 2013).

9.4.5. Các gene chỉ thị

9.4.5.1. Gene chỉ thị chọn lọc

Gene chỉ thị chọn lọc mã hoá những tính trạng mới mà ở tế bào thực vật không có, nhờ đó tạo cơ sở cho việc sàng lọc thông qua việc biểu hiện tính trạng của các tế bào chuyển gene. Không phải toàn bộ tế bào của mô thực vật đều có thể tiếp nhận gene mục tiêu khi biến nạp. Trong nhiều trường hợp, các phương pháp chuyển gene có tỉ lệ biến nạp thành công tương đối thấp. Do đó, sự có mặt đồng thời của các gene chỉ thị chọn lọc là cần thiết. Hiện nay, có hơn 50 gene chỉ thị chọn được ứng dụng; tuy nhiên, thực

tế chỉ một tỷ lệ rất nhỏ các gene được sử dụng thường xuyên (Miki và McHugh, 2004). Hai điều kiện cần thiết của một gene chỉ thị chọn lọc là: sự có mặt của nó không gây ảnh hưởng đến hoạt động của gene mục tiêu; gene có tính trội trong cả trạng thái đồng hợp và dị hợp kiểu gene, có như vậy tính trạng mới được biểu hiện. Một số điểm lưu ý khi thiết kế các gene chỉ thị chọn lọc:

- Mỗi gene chỉ thị chọn lọc sẽ phù hợp với từng đối tượng thực vật khác nhau;

- Trình tự gene cần phải nằm trong đoạn DNA dung hợp vào hệ gene thực vật (ví dụ trong vùng T - DNA);

- Gene có thể được cấu trúc cùng với gene mục tiêu dưới sự điều hoà của cùng một hệ thống điều hoà biểu hiện gene, hoặc thiết kế tách biệt hai hệ thống khác nhau;

- Gene chỉ thị chọn lọc được thiết kế cũng phải hữu ích cho việc chọn lọc trong quá trình tạo dòng. Trường hợp cần thiết, một gene chọn lọc khác có thể được thiết trên vector cho mục đích chọn lọc tế bào vật chủ trong bước tạo dòng;

- Các gene chỉ thị chọn lọc cần được điều khiển bởi các hệ thống promoter cơ định, có như vậy gene mới biểu hiện và phát huy hiệu quả chọn lọc.

Dựa vào cách tiếp cận, các gene chỉ thị chọn lọc có thể được chia thành 2 nhóm: gene chỉ thị chọn lọc có điều kiện và không điều kiện.

a. Gene chỉ thị chọn lọc có điều kiện

Các gene này tạo ra tính trạng "*đề kháng*" đối với một loại hoá chất gây độc đối với tế bào thực vật. Các mô tế bào mang gene có khả năng duy trì sự sinh trưởng bình thường trên môi trường nuôi cấy với sự có mặt của độc tố. Các gene tạo ra tính trạng kháng kháng sinh, kháng thuốc diệt cỏ, hoặc chuyển hoá cơ chất hay được sử dụng làm gene đánh dấu chọn lọc (**Bảng 9.1**).

Gene kháng kháng sinh:

Kháng sinh thường ức chế các hoạt động tổng hợp protein trong các bào quan, đặc biệt là lục lạp của tế bào thực vật. Sự biểu hiện của một gene kháng kháng sinh nào đó sẽ làm cho tế bào thực vật mang gene có thể tồn tại bình thường với sự có mặt của kháng sinh trong môi trường nuôi cấy mô; trong khi đó, các tế bào không mang gene sẽ chết. Các gene kháng kháng sinh thường được phân lập từ vi sinh vật, mã hoá cho các enzyme

xúc tác cho việc chuyển hoá cấu trúc của kháng sinh để loại bỏ tác hại của chúng. Để hoạt động có hiệu quả trong tế bào thực vật, một số các gene kháng kháng sinh từ vi khuẩn cần phải được tối ưu về trình tự. Khi chọn lọc, nồng độ kháng sinh được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tuỳ thuộc vào loài và mô tế bào thực vật. Ngoài ra, các đánh giá thực nghiệm phải cho thấy cây chuyển gene là an toàn khi dùng cho mục đích thực phẩm. Các gene kháng các kháng sinh như: streptomycin, bleomycin, chloramphenicol, streptothricin, kanamycin, hygromycin,… đã được phát triển. *Neomycin phosphotransferase II* (*nptII, neo*) kháng lại kanamycin và *hygromycin phosphotransferase* (*hpt, aph, hyg*) kháng lại hygromycin là những gene được sử dụng phổ biến vì tính chọn lọc cao và tương thích nhiều loài thực vật.

- *Neomycin phosphotransferase II (nptII)*:

Kanamycin ức chế các quá trình tổng hợp protein trong tế bào. *nptII* được phân lập từ *E. coli*, mã hoá cho enzyme neomycin phosphotransferase II. Enzyme này có thể khử hoạt tính của các kháng sinh nhóm aminoglycoside, ví dụ như kanamycin, neomycin, geneticin (G418) nhờ vào hoạt tính phosphoryl hoá nhóm 3'-hydroxyl của nhóm aminoglycoside. Để biểu hiện cơ định trong cây, vùng mã hoá *nptII* thường được cấu trúc để biểu hiện với promoter – terminator của gene *nopaline synthase* từ *A. tumefaciens* hoặc *35S RNA* của virus khảm súp lơ. Hoạt tính kháng kháng sinh của gene được điều khiển bởi promoter CaMV35S cao hơn promoter *nos*. *nptII* có thể được sử dụng làm gene đánh đấu chọn lọc cho cả mục đích chuyển gene nhân và lục lạp.

- *Hygromycin phosphotransferase (hpt)*:

Gene này được phân lập từ *E. coli*, mã hoá cho enzyme hygromycin B phosphotransferase – một enzyme có khả năng phosphoryl hoá, qua đó khử hoạt tính của kháng sinh hygromycin B. *hpt* cũng đã được cấu trúc với hệ thống điều khiển của gene *nos* cho sự biểu hiện trong tế bào thực vật. Hygromycin B gây độc với tế bào mạnh hơn kanamycin, do đó *hpt* thường được thay thế trong trường hợp chọn lọc bằng *nptII* không có tác dụng.

Gene kháng thuốc diệt cỏ:

Trước đây, các gene mã hoá cho các enzyme khử hoạt tính độc của các loại thuốc diệt cỏ như: sulphonylureas, glyphosate, cyanamide, bromoxynil, phosphinothricin,…

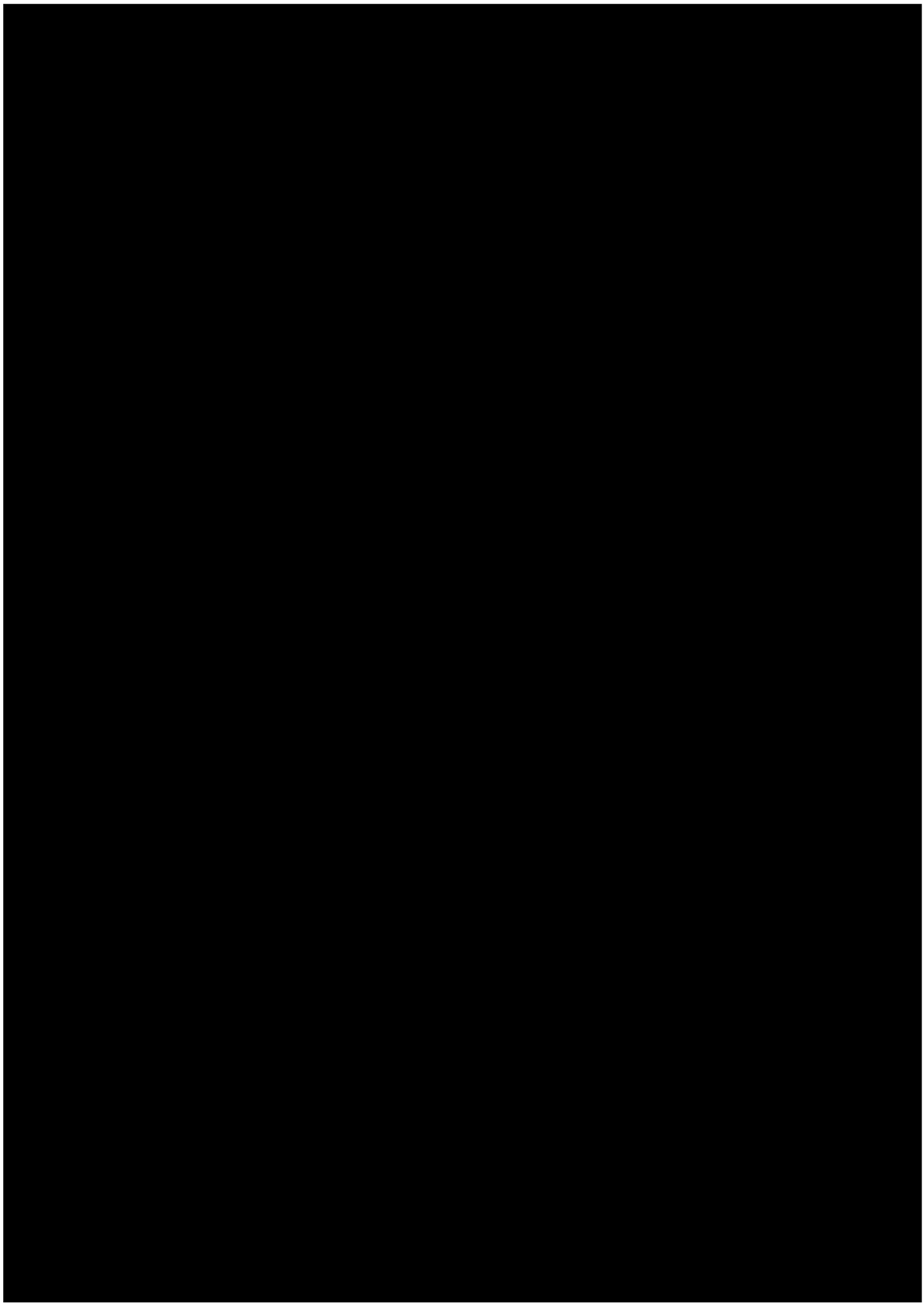
đã được sử dụng như những gene chỉ thị chọn lọc. Trong số đó, các gene kháng phosphinothricin được ứng dụng phổ biên trong nghiên cứu và sản xuất cây chuyển gene. Phosphinothricin là một chức ức chế cạnh tranh đối với enzyme glutamine synthase - một enzyme đồng hoá ammonia ở thực vật. Do đó, sự có mặt của phosphinothricin đã dẫn đến sự tích luỹ của ammonia, gây độc đối với tế bào. Tuy nhiên, hoạt tính của phosphinothricin bị mất đi khi có mặt enzyme phosphinothricin N-acetyltransferase thông qua phản ứng acetyl hoá nhóm amoni tự do của phosphinothricin với sự tham gia của acetyl CoA. Có hai gene mã hoá cho phosphinothricin N-acetyltransferase: *biolaphos resistance* (*bar*) từ *Streptomyces hygroscopicus* và *phosphinothricin acetyltransferase* (*pat*) từ *Streptomyces viridiochromogenes*. Cả *bar* và *pat* đã được cấu trúc và biểu hiện có hiệu quả với sự điều khiển của promoter CaMV35S trong các cây một lá mầm. Do gene *nptII* hoạt động ít hiệu quả ở cây một lá mầm, nên *bar* và *pat* là giải pháp được thay thế cho mục đích chọn lọc.

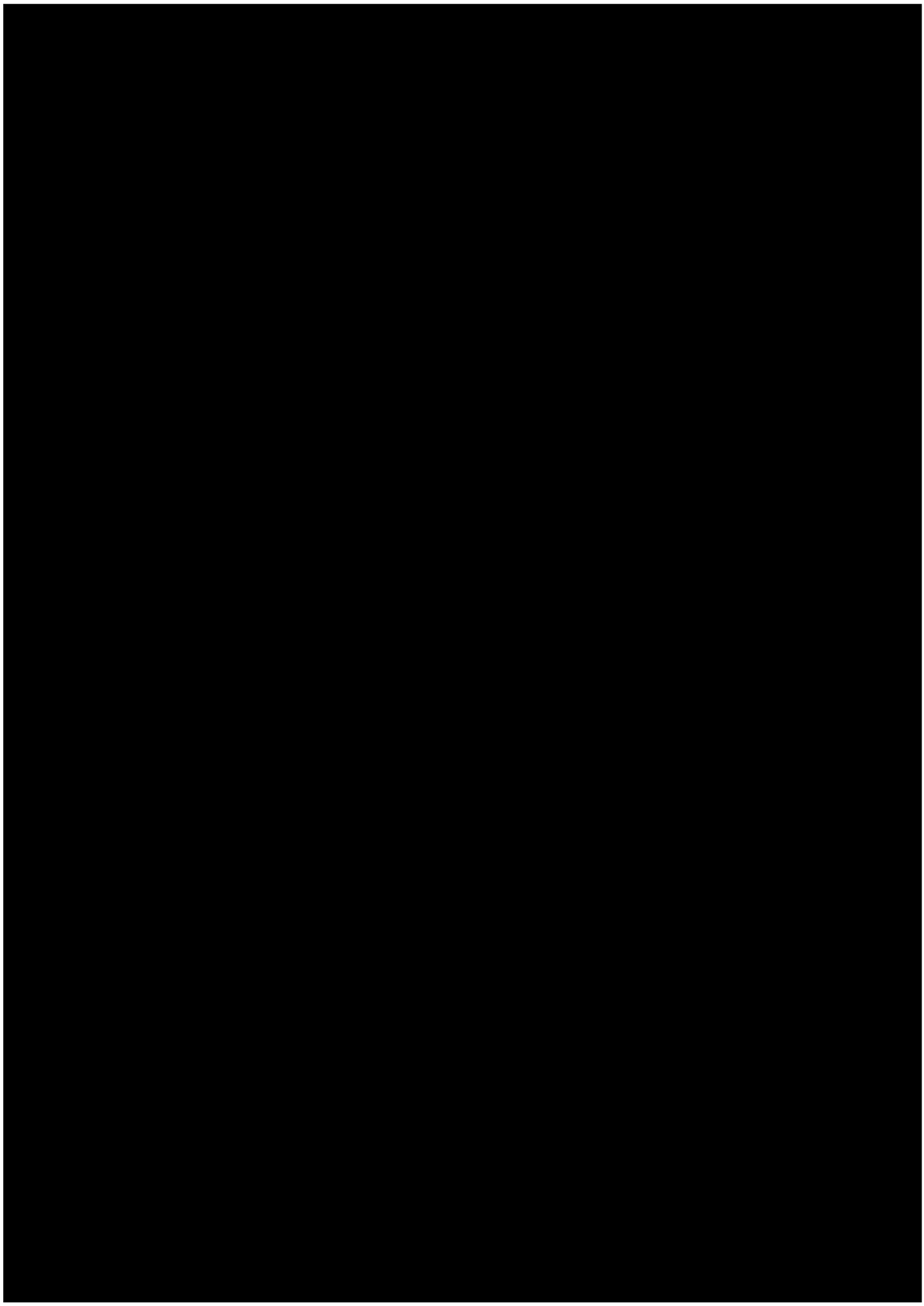
Gene chuyển hoá cơ chất:

Khác với các gene kháng kháng sinh và thuốc diệt cỏ, các gene chuyển hoá mã hoá cho các enzyme xúc tác chuyển hoá các cơ chất, thường là nguồn dinh dưỡng, vốn không được sử dụng bởi tế bào thực vật thành dạng hữu ích cho tế bào. Do đó, những tế bào chuyển gene vẫn duy trì sự sinh trưởng, trong khi các tế bào bình thường sẽ rơi vào trạng thái khuyết dưỡng và chết đi. Gene chuyển hoá mannose: *phosphomannose isomerase* (*manA*) từ *E. coli*, và xylose: *xylose isomerase* (*xylA*) từ *Streptomyces rubiginosus* là những ví dụ điển hình. Biểu hiện của gene *manA* hoặc *xylA* trong tế bào sẽ chuyển hoá các cơ chất để cung cấp nguồn carbon cho đường phân. Thuận lợi của các gene chuyển hoá cơ chất là có thể áp dụng với đa dạng các loài thực vật và hiệu quả biến nạp tương đối cao vì các tế bào chuyển không bị ảnh hưởng cực đoan như các gene kháng kháng sinh hay thuốc trừ sâu.

b. Các gene đánh dấu chọn lọc không điều kiện

Đặc trưng của các hệ thống gene đánh dấu chọn lọc không điều kiện đặc là không sử dụng các hoá chất chọn lọc. Việc chọn lọc dựa vào sự thay đổi kiểu hình sinh trưởng hoặc biệt hoá có tính khác biệt của cá thể chuyển gene so với cá thể không chuyển gene. Để tạo sự khác biệt, các gene gắn liền với quá trình phát sinh hình thái, ví dụ phát sinh





Tuy nhiên, mẫu quan sát không còn nguyên bản cho các quan sát khác và cơ chất có giá thành cao.

b. Green fluorescent protein (GFP)

GFP là một photoprotein được mã hoá bởi *gfp* phân lập từ sứa biển. Đây là một protein bền và có khả năng tự phát quang khi nhận kích thích từ nguồn sáng UV. Vì *gfp* nguyên bản có những nhược điểm gây độc tế bào với nồng độ cao và tạo ra các ảnh hưởng thứ cấp nên nó đã được chỉnh sửa để tạo ra các phiên bản tốt hơn. Hiện nay, hệ thống *gfp* bao gồm nhiều biến thể bền và có màu sắc của ánh sáng tín hiệu phát ra khác nhau, tạo thuận lợi cho việc xác định vị trí biểu hiện nhiều gene cùng lúc.

Ưu điểm của *gfp* là kích thước nhỏ nên dễ dàng tạo dòng và cho phép quan sát ở mức độ tế bào vì độ nhạy cao. Ngoài ra, protein là bền và cho phép quan sát tín hiệu theo thời gian thực mà không làm ảnh hưởng đến mẫu.

c. Luciferase (luc):

Gene *luc* mã hoá enzyme luciferase, nó được phân lập từ đom đóm. Enzyme này xúc tác phản ứng decarboxyl hoá oxi hoá cơ chất luciferin tạo thành dạng hợp chất oxyluciferin có tính phát quang. Ánh sáng phát ra có thể được thu nhận bởi một thiết bị thu nhận tín hiệu. Cường độ ánh sáng có sự tương quan với hoạt động của enzyme. Vì thời gian bán phân rã của oxyluciferin ngắn nên coenzyme A đã được bổ sung vào phản ứng để tăng độ bền vững của tín hiệu để kéo dài thời gian đo. Trước đây, hỗn hợp chứa cơ chất được phun lên bề mặt mẫu tế bào chuyển gene, sau đó ép mẫu trên một film trước khi quan sát. Tuy nhiên, hiện nay có những thiết bị rất nhạy và có thể thu nhận tín hiệu trực tiếp từ mẫu. Thuận lợi của hệ thống *luc* là nhanh, nhạy và chính xác vì thời gian phân rã ngắn. Ngoài ra, hệ thống cho phép quan sát hoạt động của enzyme theo thời gian thực vì mẫu quan sát không bị ảnh hưởng.

Bảng 9.2. Các gene chỉ thị báo cáo sử dụng phổ biến trong chuyển gene thực vật

Gene đánh dấu chỉ thị	Kí hiệu	Nguồn phân lập	Phương pháp quan sát
β-glucuronidase	*gusA/uidA*	*E. coli*	Huỳnh quang (fluorescence)/ hoá mô (histochemical)

Green fluorescent protein	*gfp*	*Aequoera victoria (jellyfish)*	Huỳnh quang
Chloramphenicol acetyltransferase	*cat*	*E. coli*	Phóng xạ
Luciferase	*luc*	*Photinus pyralis (firefly)*	Hoá phát quang (luminescence)
Luciferase	*luxA, luxB*	*Vibrio harveyi*	Hoá phát quang (luminescence)

9.5. Một số vấn đề lưu ý khi thiết kế vector tái tổ hợp mang gene mục tiêu

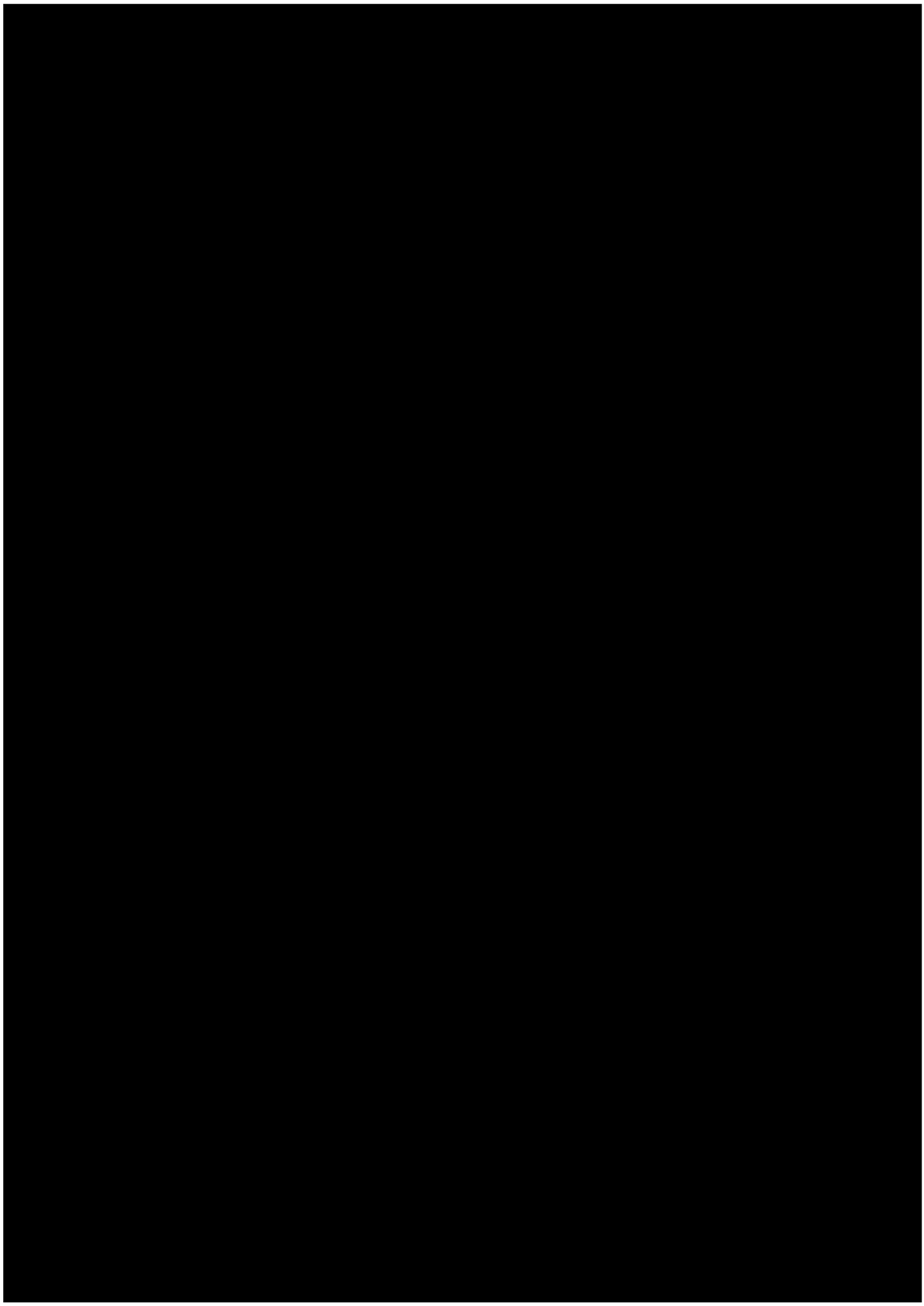
Ngoài những yếu tố tham gia vào quá trình điều hoà biểu hiện gene ở thực vật, thì hiệu quả của biểu hiện gene mục tiêu trong tế bào thực vật phụ rất nhiều vào các yếu tố được lựa chọn bổ sung vào cấu trúc, đặc biệt là những yếu tố ảnh hưởng đến sự tích luỹ và bền vững của mRNA. Để đảm bảo sự biểu hiện của gene trong tế bào thực vật, ngoài việc chọn lựa vector, promter và gene chỉ thị, trong quá trình thiết kế cần phải chú ý đến các vấn đề về sắp xếp gene, sử dụng các codon và trình tự chức năng tăng cường hiệu quả biểu hiện.

9.5.1. Sắp xếp gene

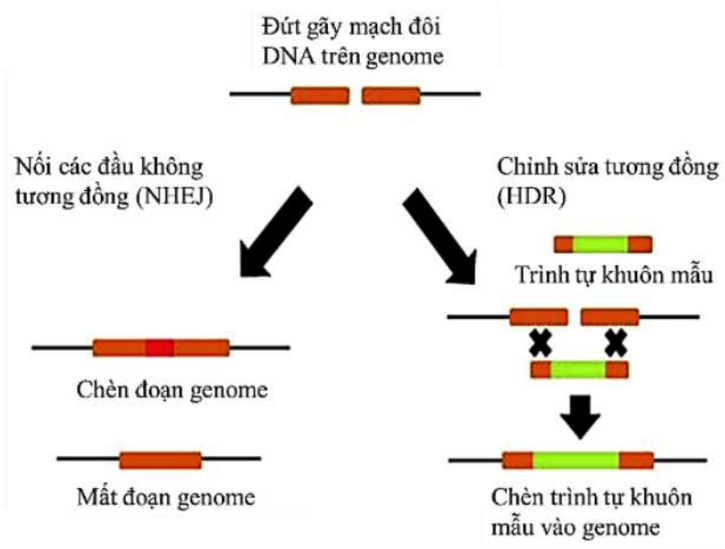
Nếu nhiều hơn một gene mục tiêu được tạo dòng, ví dụ trường hợp biểu hiện nhiều gene cùng lúc, thì nên sử dụng các cặp promoter và terminator khác nhau cho mỗi gene để hạn chế hiện tượng im lặng gene (gene siliencing). Ngoài ra, các gene cần được bố trí cách nhau một khoảng cách nhất định, tránh sát nhau hoặc chồng lên nhau. Ngoài ra, chiều 5' - 3' của gene phải khác nhau để tránh sự tương tác không mong muốn do các trình tự lặp lại đảo chiều giữa các gene (nếu có) gây ra.

9.5.2. Sử dụng codon

Trong một số trường hợp, gene mục tiêu có chứa các codon hiếm hoặc không phổ biến trong thực vật, đặc biệt là các gene mục có nguồn gốc từ vi sinh vật. Điều này sẽ ảnh hưởng đến sự bền vững của sản phẩm mRNA do tính lạ của codon cũng như ảnh hưởng đến quá trình dịch mã. Vì vậy, các codon này cần được thay thế bởi các codon



các đột biến này là gene bị mất chức năng, do đó con đường NHEJ thường được ứng dụng để chỉnh sửa bất hoạt gene không mong muốn (gene knock-out).



Hình 9.10. Hai cách sửa chữa đứt gãy DNA sợi đôi, nối các đầu không tương đồng và chỉnh sửa tương đồng, với sự có mặt của đoạn trình tự khuôn mẫu (Acharya và cộng sự, 2020)

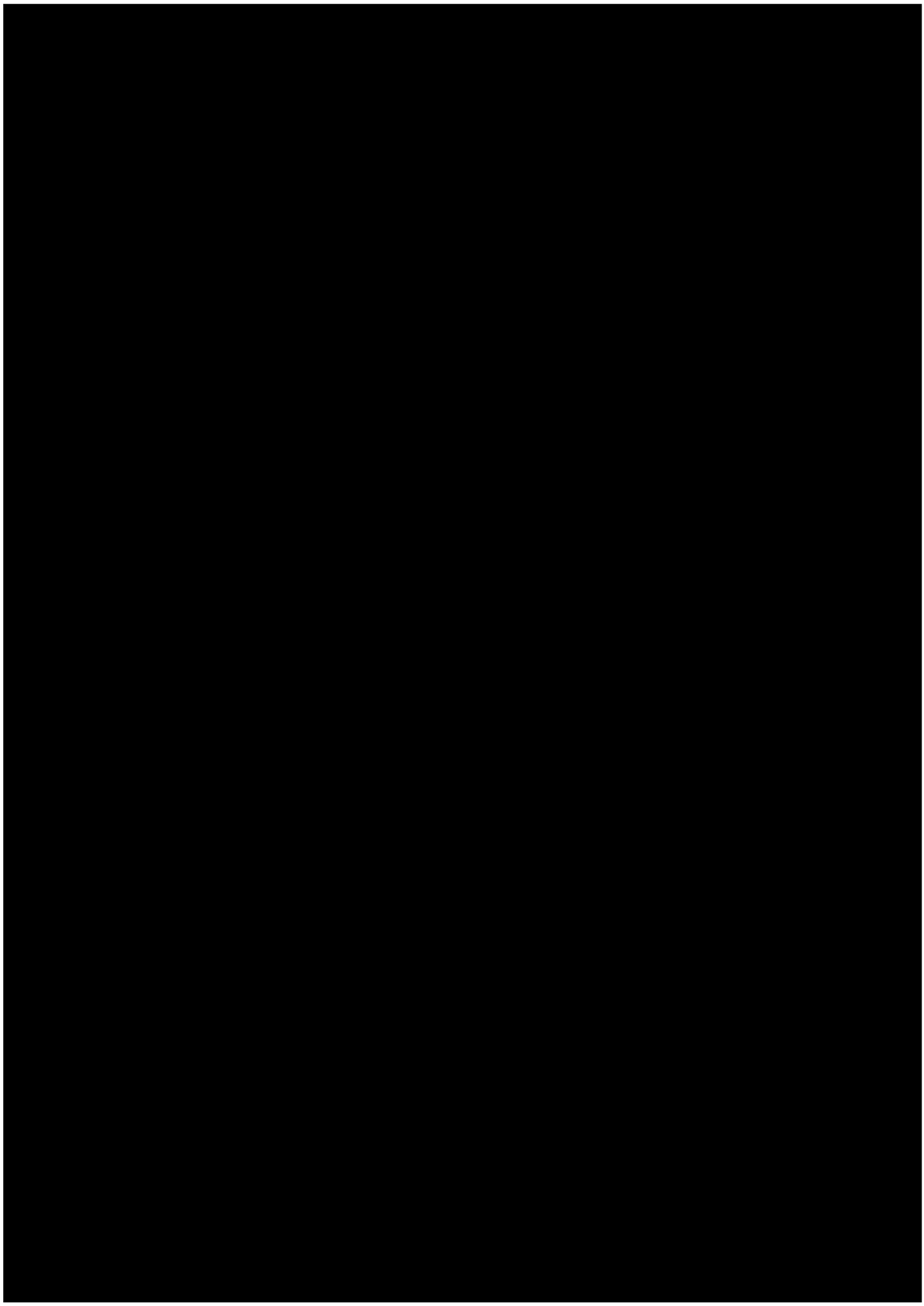
- Sửa chữa tương đồng (homology-directed repair, HDR):

Cách sửa chữa có độ chính xác cao, cần có trình tự tương đồng làm khuôn mẫu. Trình tự khuôn mẫu này có thể là một đoạn DNA nhân tạo có trình tự tương tự với vị trí đứt gãy DSB, hoặc là cassette chứa gene quan tâm thiết kế cùng với các gene đánh dấu trên vector plasmid.

9.6.2. Các loại hệ thống chỉnh sửa gene

9.6.2.1. Zinc finger nuclease

Zinc finger nuclease (ZFN) là hệ thống thuộc thế hệ thứ nhất của các endonuclease. Hệ thống này có thể nhận biết các trình tự dài 18-24 nucleotide. ZFN bao gồm protein dung hợp từ các miền Zinc finger (có chức năng nhận biết trình tự nucleotide, mỗi miền nhận biết một bộ ba nucleotide) và enzyme cắt FokI. ZFN hoạt động dưới dạng dimer, trong đó mỗi monomer sẽ nhận biết và cắt ở một vị trị trên một mạch DNA, từ đó tạo ra đứt gãy DSB.



9.6.2.3. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - Cas

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - Cas (CRISPR - Cas) là hệ thống chỉnh sửa gene bao gồm hai thành phần liên hợp: CRISPR là các trình tự đối xứng, lặp lại được ngăn cách bởi các vùng đệm và Cas là protein hoạt động cùng với CRISPR (CRISPR-associated protein).

Từ khi khả năng chỉnh sửa gene củ hệ thống CRISPR - Cas được khám phá, chúng đã trở thành công cụ vô cùng hữu ích và nhanh chóng được ứng dụng vào chỉnh sửa gene. Ưu điểm lớn nhất của CRISPR - Cas là khả năng nhận biết trình tự thông qua một trình tự RNA hướng dẫn (guide RNA) thay vì các protein như ZFN hay TALEN. Do đó, phương pháp này tối ưu được thời gian hơn, do đó đặc biệt phù hợp với các dự án có quy mô lớn.

Những ứng dụng của hệ thống CRISPR - Cas đã tạo ra các giống gạo, ngô, lúa mì, cà chua, khoai tây, thuốc lá, bông, đậu nành, bắp cải mang các tính trạng quan trọng như: chịu nhiệt, chịu lạnh, chống chịu sâu bệnh hại do virus, vi khuẩn, nấm. Trong số đó, rất nhiều giống cây được tạo ra thông qua các phương pháp không chứa gene ngoại lai (transgene-free system) (Sved và cộng sự, 2020).

9.6.3. Hệ thống CRISPR - Cas9

9.6.3.1. CRISPR - Cas9 là yếu tố miễn dịch ở vi khuẩn

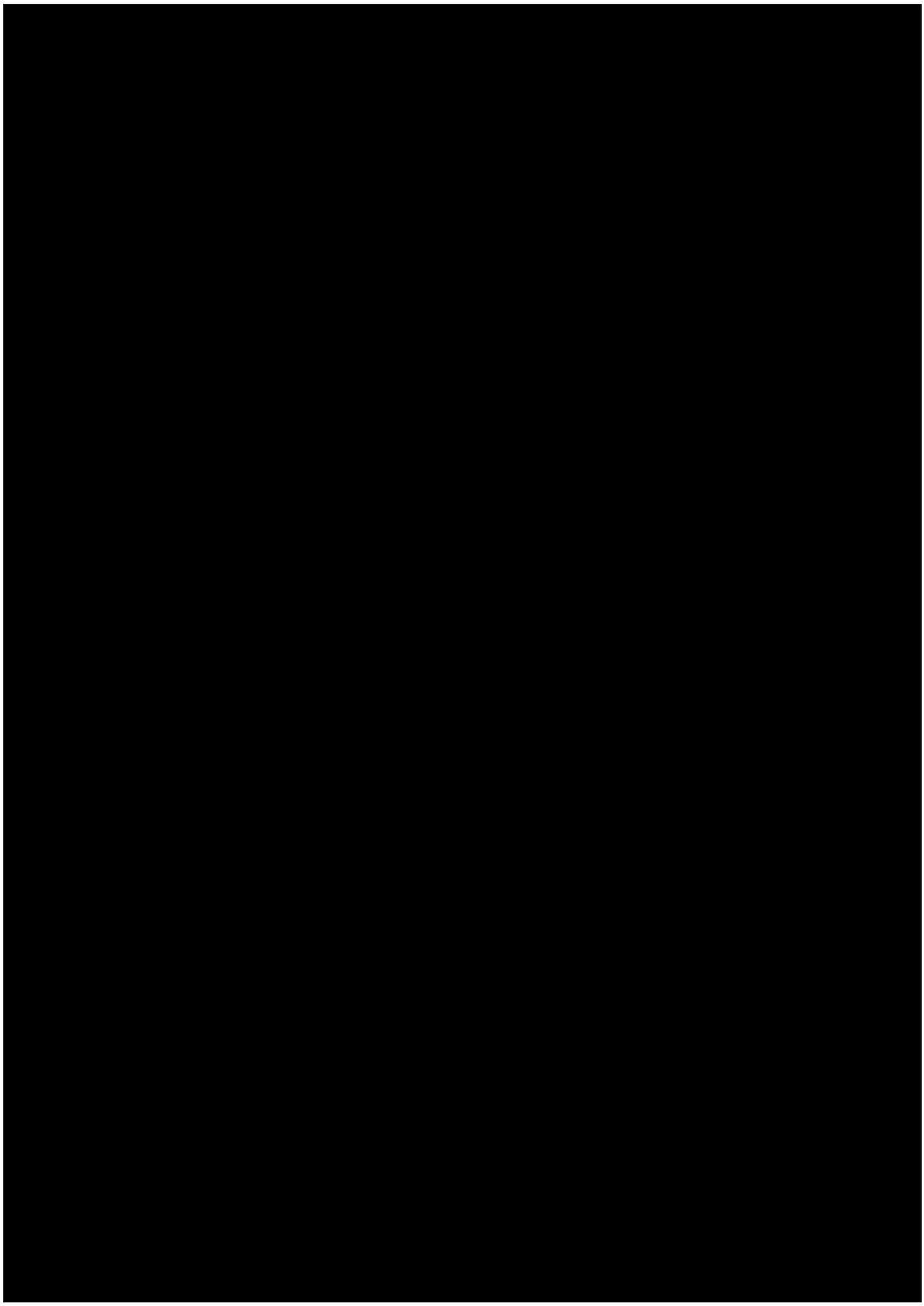
CRISPR - Cas9 là hệ thống CRISPR/Cas loại II, được lần đầu phát hiện ở vi khuẩn *Streptococcus pyogenes*, chống lại sự xâm nhập của các thực khuẩn thể. Hệ thống này nhận biết và tạo ra đứt gãy DSB trên hai mạch DNA của thực khuẩn thể. Sau đó, thông qua cơ chế chỉnh sửa NHEJ hoặc HDR khiến DNA xâm nhập bị mất chức năng do thay đổi mất đoạn hoặc chèn đoạn. Đây là hệ thống CRISPR - Cas đơn giản nhất, cũng là hệ thống được nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất trong chỉnh sửa gene.

9.6.3.2. Các thành phần của hệ thống CRISPR - Cas9 ở vi khuẩn

a. Locus CRISPR

Locus CRISPR thường gồm các thành phần sau:

- Các trình tự palindrome lặp lại, số lần lặp lại của các trình tự này là khác nhau ở các loài khác nhau;



sẽ cắt một mạch của đoạn DNA mục tiêu, tạo đứt gãy DSB đầu bằng. Ngoài ra, để Cas9 có thể hoạt động, cần có sự có mặt của tracrRNA, là phân tử RNA hoạt hóa crRNA theo cơ chế *trans*. Phân tử RNA lai giữa crRNA và tracrRNA (guide RNA) sẽ định hướng cho Cas9 nhận biết và cắt bất kỳ đoạn DNA nào chứa đồng thời trình tự bổ sung với crRNA và trình tự PAM.

9.6.3.3. Cải tiến CRISPR-Cas9 thành công cụ chỉnh sửa gene

CRISPR - Cas9 được ứng dụng như một công cụ chỉnh sửa gene hiệu quả. Hiện nay, công cụ này chỉ đơn giản gồm một protein Cas với hoạt tính nuclease và một phân tử guide RNA nhân tạo (synthetic guide RNA, sgRNA) được lập trình để nhận biết và cắt trình tự mong muốn tạo thành DSB đầu bằng.

Ngoài ra, để thuận lợi trong ứng dụng chỉnh sửa hệ thực vật, một số thay đổi trong hệ thống CRISPR - Cas9 nguyên thủy như: thay đổi codon để protein Cas9 bền vững hơn trong thực vật, thiết kế cassette gene chứa các promoter cơ định hoặc cảm ứng nhằm biểu hiện gRNA và Cas9 trong cùng một tế bào.

Nhìn chung, việc thiết kế cassette gene và quy trình chuyển trình tự mã hóa cho gRNA và Cas9 tương tự như đối với các gene quan tâm khác. Vì vậy, cây trồng mới được tạo ra vẫn được xem là thực vật biến đổi gene vì chứa gene ngoại lai, do đó vẫn tuân thủ các nguyên tắc an toàn sinh học (**Chương 11**). Tuy nhiên, sau khi đã xác định được các cây con mang tính trạng mong muốn thông qua hệ thống CRISPR - Cas9, các gene mã hóa cho gRNA và Cas9 có thể được loại bỏ qua phân li độc lập và tổ hợp tự do ở các thế hệ cây con (định luật Mendel). Bên cạnh đó, nếu cassette gene được chuyển vào tế bào thực vật thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* thì việc biểu hiện tạm thời các gene mã hóa cho Cas9 và gRNA cũng cho phép tạo ra các cá thể cây con không mang gene ngoại lai nhưng vẫn có tính trạng mong muốn.

Ngoài ra, một số quy trình khác cũng được nghiên cứu để đưa các thành phần của hệ thống CRISPR/Cas9 dưới dạng phức hợp Cas protein-sgRNA (ribonucleo-protein, RNP) vào đối tượng mong muốn. Trong số đó có các phương pháp như vận chuyển thông qua liposome (lipid nanoparticle-mediated transfection, lipofection), phương pháp dội bom hay vận chuyển vào tế bào trần bằng điện biến nạp hoặc hóa biến nạp.

9.6.3.4. Ưu và nhược điểm của hệ thống CRISPR - Cas9

a. Ưu điểm

- Dễ thiết kế và điều chỉnh để nhận biết trình tự mục tiêu;

- Có nhiều ứng dụng như knock-in, knock-out gene, cho phép chèn đoạn gene kích thước lớn;

- Có thể sử dụng cho gần như tất cả sinh vật;

- Hạn chế lo ngại gene ngoại lai tồn tại trong các sản phẩm từ sinh vật biến đổi gene.

b. Nhược điểm

- Có thể xảy ra các đột biến ngoài ý muốn, có thể do các con đường sửa chữa đứt gãy DSB hoặc do Cas9 protein tác động sai trình tự mục tiêu;

- Có nguy cơ xảy ra hiện tượng virus escape và sự xuất hiện các virus kháng CRISPR khi ứng dụng tạo ra giống cây trồng kháng virus;

- Dù không chứa gene ngoại lai trong sản phẩm cuối cùng, cây trồng tạo ra nhờ CRISPR - Cas9 vẫn được xem là thực vật biến đổi gene theo quy định của EU, do đó vẫn mất thời gian và chi phí để phát triển giống cây trồng mới.

9.6.3.5. Ứng dụng

Một số ứng dụng của CRISPR/Cas9 trong chỉnh sửa geneme:

- Gene knock-in thông qua con đường HDR kế hợp với trình tự gene quan tâm;

- Gene knock-out thông qua con đường NHEJ;

- Tạo đột biến điểm bằng cách dung hợp protein Cas bất hoạt với enzyme cystydine deaminase cùng sgRNA; hoặc dung hợp protein Cas với tRNA adenosine deaminase để thay đổi nucleotide G thành A, C thành T (Komor và cộng sự, 2016).

9.7. Các tính trạng cần quan tâm trong phát triển cây chuyển gene

9.7.1. Chuyển gene tạo cây kháng thuốc diệt cỏ

Các phương thức canh tác nông nghiệp hiện đại ở quy mô sản xuất lớn đều cần phải sử dụng thuốc diệt cỏ dại. Vấn đề đặt ra là khi phun thuốc diệt cỏ thì chỉ diệt cỏ mà

không gây hại đến cây trồng. Muốn vậy các cây trồng cần phải có khả năng kháng thuốc diệt cỏ. Cần phải tìm các gene có tác dụng kháng thuốc diệt cỏ như các gene tạo enzyme làm mất hoạt tính của thuốc diệt cỏ, hoặc các enzyme tăng cường hoặc thay thế cho các enzyme thực vật dễ bị phân hủy bởi thuốc diệt cỏ. Các nguồn tiếp cận để phân lập gene có thể từ vi sinh vật hoặc thực vật có khả năng chống lại thuốc diệt cỏ. Ví dụ, các nghiên cứu và ứng dụng thành công khi phân lập và chuyển vào cây trồng gene mã hoá cho enzyme glyphosate N-acetyltransferase từ vi khuẩn. Gene này có khả năng giúp cây trồng đề kháng với thuốc diệt cỏ glyphosate (**Chương 10**).

9.7.2. Chuyển gene tạo cây kháng sâu

Sâu bệnh là một vấn đề phổ biến và nan giải đối với sản xuất nông nghiệp. Sự có mặt của sâu bệnh sẽ làm ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây và gây ra những bệnh truyền nhiễm, qua đó làm giảm năng suất và chất lượng sản phẩm. Các loại sâu gây bệnh rất đa dạng, nên các loại thuốc trừ sâu bệnh cũng phong phú bao gồm cả thuốc hoá học và sinh học. Các loại thuốc sinh học đang dần chiếm ưu thế. Tuy nhiên, sử dụng thuốc trừ sâu dù sinh học hay hoá học cũng gây ra những ảnh hưởng bất lợi đối với môi trường vì dư lượng. Để hạn chế sử dụng thuốc trừ sâu, con người cần phát triển các giống cây trồng sở hữu tính trạng kháng sâu bệnh, đặc biệt kháng sâu với phổ rộng. Khai thác các gene mã hoá cho các protein gây độc trực tiếp hoặc gián tiếp bởi những sản phẩm chuyển hoá đối với hệ thần kinh hoặc tiêu hoá của sâu bệnh là các cách tiếp cận khả quan. Các nguồn gene có thể từ vi sinh vật hoặc thực vật, trong đó hiện nay các loài thực vật hoang dại có khả năng kháng sâu bệnh có thể được xem là nguồn tiềm năng. Ví dụ điển hình là việc phân lập và ứng dụng thành công gene mã hoá protein độc tố Cry từ *Bacillus thuringiensis*, qua đó giúp cây trồng kháng sâu hiệu quả (**Chương 10**).

9.7.3. Chuyển gene tạo cây kháng nấm bệnh

Nấm gây bệnh là những tác nhân gây hại lớn đến cây trồng, nhất là ở các nước nhiệt đới có độ ẩm cao. Các enzyme làm thoái hóa các thành phần chính của vỏ tế bào nấm, chủ yếu là chitin và β-1,3 glucan đang được chú ý. Một số nghiên cứu cho thấy khi chuyển gene *chitanase* vào cây thuốc lá đã tăng hoạt tính kháng nấm gây hại. Sự biểu hiện đồng thời của cả hai gene *chitinase* và *glucanase* trong thuốc lá làm cho cây có tính kháng nấm gây hại cao hơn cây được chuyển một gene độc lập. Bên cạnh đó, các gene

ức chế hoạt động của ribosome (ribsomal inhibition protein-RIP) cũng cho thấy tiềm năng kháng nấm tốt.

9.7.4. Chuyển gene tạo cây kháng virus gây bệnh

Virus thực vật gây hại nghiêm trọng cho cây trồng vì đây là loại bệnh không thể dùng các loại thuốc thông thường để phòng trừ. Do vậy, tiếp cận bằng con đường công nghệ gene để tạo cây kháng virus là giải pháp khả thi hiện nay. Có nhiều cách tiếp cận để tạo cây kháng virus:

- Chuyển gene mã hóa protein có khả năng ức chế sự xâm nhiễm và nhân bản của virus trong tế bào thực vật, ví dụ enzyme ribozyme hoặc các protein vỏ virus. Khi có mặt gene mã hóa protein vỏ trong tế bào cây thì sẽ gây hiệu ứng kìm hãm sự tổng hợp protein vỏ của gene ở virus. Do đó, ức chế quá trình nhân bản của virus. Ví dụ, gene mã hoá protein vỏ virus khảm thuốc lá được chuyển vào cây thuốc lá qua đó giúp cây kháng lại sự tấn công của virus này.

- Chuyển gene có trình tự đối bản (antisens) với RNA của virus. Các đối bản này sẽ ức chế quá trình sao chép và phiên mã của virus. Cách tiếp cận này đang được các nhà khoa học tập trung nghiên cứu vì tính hiệu quả của nó.

9.7.5. Chuyển gene tạo cây kháng điều kiện ngoại cảnh bất thuận

Những biến đổi khí hậu đã bắt đầu tạo những áp lực lớn đến sản xuất nông nghiệp, đặc biệt trước áp lực gia tăng của dân số thế giới, dự kiến hơn 9 tỷ vào năm 2050. Các hệ quả của biến đổi khí hậu là tạo ra những điều kiện bất thuận đối với sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng, qua đó làm giảm năng suất và diện tích canh tác. Các điều kiện bất thuận thường thấy là nhiệt độ tăng giảm đột ngột, khô hạn, xâm nhập mặn, ô nhiễm môi trường và tia cực tím. Do đó, việc phát triển các cây trồng chuyển gene sở hữu các tính trạng kháng với các điều kiện bất thuận có vai trò quan trọng trong sản xuất nông nghiệp, trong đó hiện nay các cây trồng chịu hạn và mặn cần được ưu tiên.

Hai cách tiếp cận để phát triển các cây trồng chuyển gene cho mục đích này:

- Kích hoạt các gene vốn dĩ tồn tại trong hệ gene thực vật nhưng chung không được biểu hiện;

- Khai thác những gene có tính kháng ở các nguồn thực vật hoang dại, đặc biệt các loài sống trong điều kiện bất thuận, hoặc từ các vi sinh vật. Các nghiên cứu cho thấy phần lớn những yếu tố bất lợi gây hại trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua sự cảm ứng tích luỹ những gốc có tính oxi hoá cao (reactive oxygen species, ROS). Vì vậy, khai thác những gene làm hạn chế ảnh hưởng của ROS có thể mang đến tiềm năng kháng điều kiện bất thuận.

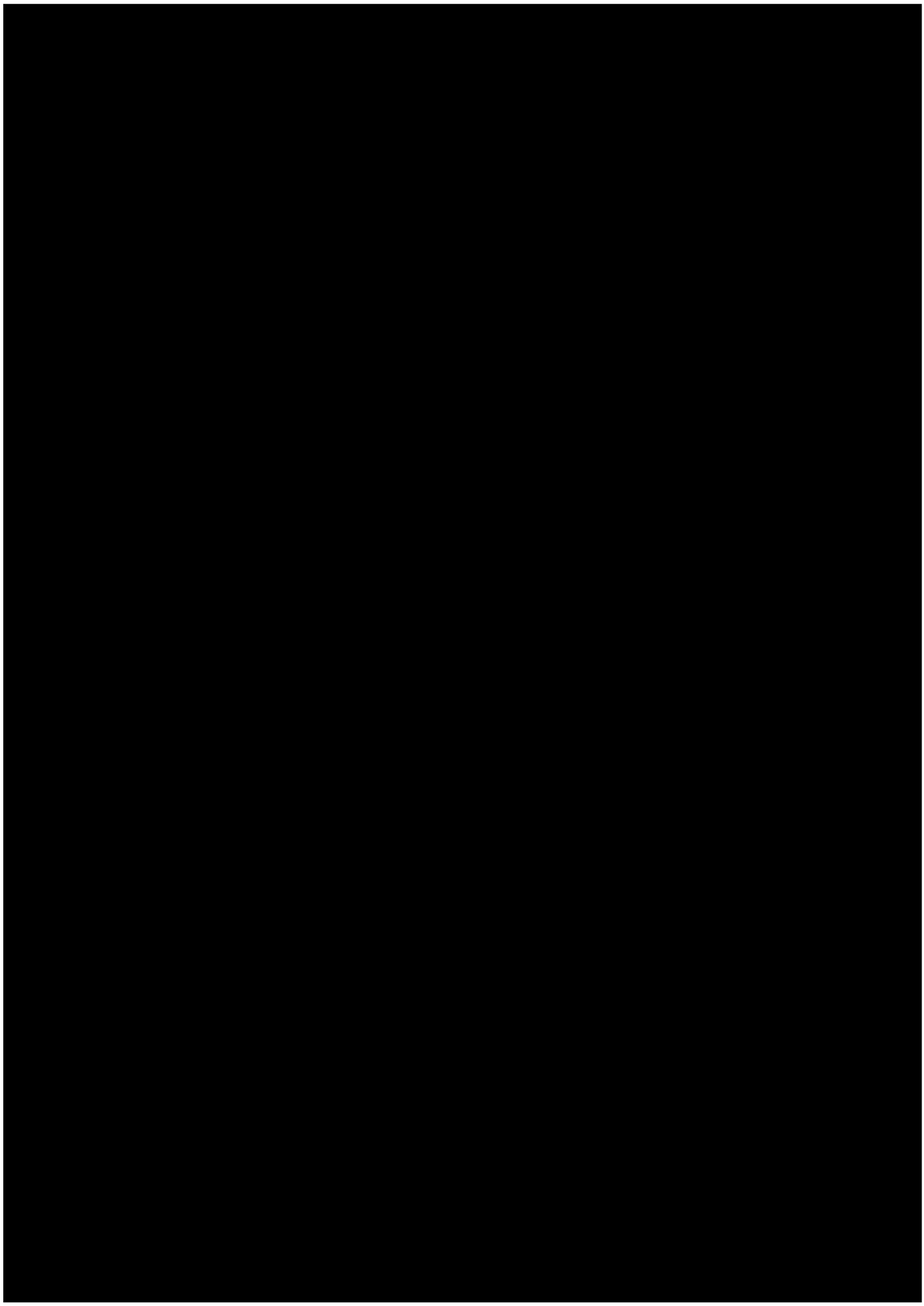
Trên thực tế, các trính trạng kháng điều kiện bất thuận thường chịu ảnh hưởng của đa gene bởi sự tham gia của nhiều yếu tố khác nhau, do đó một nghiên cứu toàn diện cần được triển khai để phát triển thành công cây chuyển. Các nghiên cứu về khả năng kháng điều kiện bất thuận ở thực vật biến đổi gene vẫn còn trong giai đoạn nghiên cứu. Một số ví dụ được trình bày ở **Chương 10**.

9.7.6. Chuyển gene tạo cây sản xuất những loại protein mới

Cách tiếp cận này dựa vào nguyên lí "tế bào thực vật là nhà máy sản xuất hoặc gia công các sản phẩm protein ngoại lai". Các gene mã hoá cho các sản phẩm protein có giá trị hoặc tham gia chuyển hoá tạo hợp chất có giá trị, thường là các protein dược phẩm như kháng nguyên và kháng thể, được đưa vào trong thực vật để sản xuất. Bằng con đường này, kết hợp với công nghệ nuôi cấy tế bào, hứa hẹn sẽ tạo ra những hệ thống sản xuất có hiệu quả ở công nghiệp. Ví dụ điển hình là các nghiên cứu thành chuyển gene mã hoá nội độc tố đường ruột (gene LTB) của vi khuẩn *E. coli* vào nhiều loại cây trồng với định hướng sản xuất các sản phẩm vaccine uống.

9.7.7. Chuyển gene tạo cây cải thiện chất lượng dinh dưỡng

Chuyển các gene mã hoá cho những enzyme tham gia quá trình chuyển hoá nội bào, qua đó nâng cao chất lượng của các sản phẩm từ cây trồng cũng là hướng được các nhà khoa học quan tâm. Các tính trạng do các gene chuyển tạo ra bao như tăng hàm lượng các thành phần dinh dưỡng như acid amin, glucid, lipid, vitamine, tinh dầu,… hoặc những hợp chất thứ cấp có giá trị vốn dĩ không được sản xuất ở điều kiện bình thường. Gạo chuyển gene mã hoá cho các enzyme của chuyển chuyển hoá và tích luỹ carotenoid, từ đó tổng hợp β-carotene ở phôi nhũ là một ví dụ điển hình trong việc cải tiến dinh dưỡng cây trồng.



CÂU HỎI ÔN TẬP

Câu 1: Phân tích vai trò các bước cơ bản của công nghệ tạo thực vật chuyển gene ?

Câu 2: Vì sao phải phân lập gene mục tiêu ? Các cách phân lập gene mục tiêu ?

Câu 3: Tại sao nói công nghệ DNA tái tổ hợp có vai trò quan trọng trong tạo dòng gene ?

Câu 4: Một vector sử dụng trong chuyển gene thực vật cần có những thành phần nào ? Trình bày vai trò của các thành phần cơ bản của một vector plasmid ?

Câu 5: So sánh sự khác biệt giữa các loại promoter cơ định, đặc hiệu và cảm ứng ?

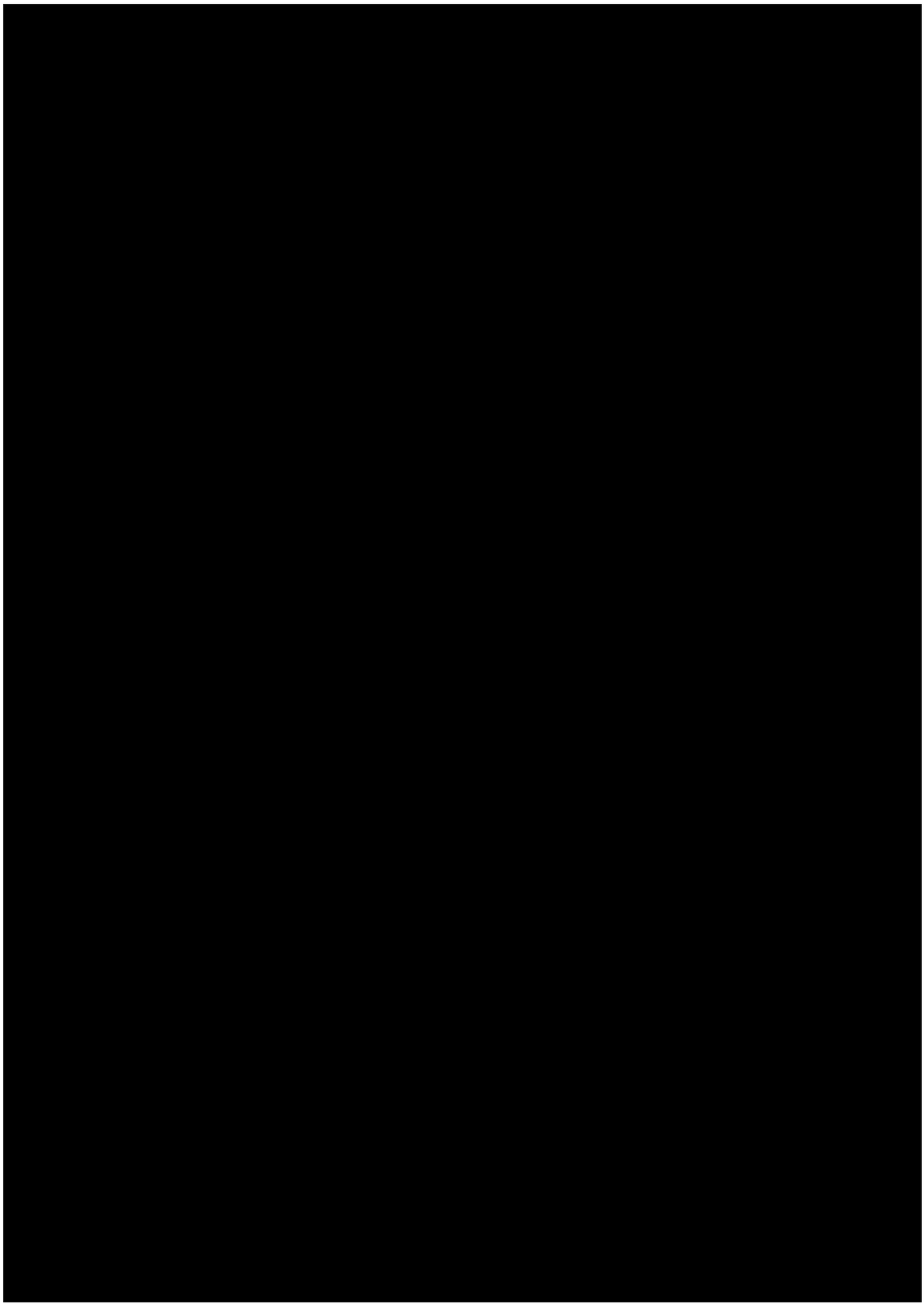
Câu 6: Giải thích các yếu tố ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gene trong cây chuyển gene ?

Câu 7: Phân tích nguyên lý, ưu và nhược điểm của các phương pháp tạo dòng ?

Câu 8: So sánh sự khác nhau giữa vector liên hợp và vector nhị thể ?

Câu 9: Giải thích lý do các tính trạng cần được quan tâm trong sản xuất cây chuyển gene ?

Câu 10: Giải thích nguyên lý chỉnh sửa gene của các hệ thống chỉnh sửa gene ? So sánh ba hệ thống chỉnh sửa gene: ZFN, TALEN và CRISPR - Cas ?



phương pháp chuyển gene vật lý. Ngược lại, các phương pháp gián tiếp nghĩa là thông qua vi sinh vật trung gian, có thể là vi khuẩn hoặc virus để chuyển gene vào tế bào và tích hợp vào genome thực vật. Vi sinh vật trung gian được sử dụng phổ biến nhất là các loài vi khuẩn *Agrobacterium.*

Sau khi thực hiện chuyển gene, mô hoặc tế bào thực vật được chọn lọc để xác nhận hiệu quả chuyển gene. Việc xác nhận này được thực hiện theo các mức độ từ DNA, RNA cho tới protein được biểu hiện bằng các kỹ thuật phân tích phân tử. Những tế bào được xác định là mang gene mục tiêu được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng chứa các protoplast thực vật phù hợp để có thể tái sinh thành cây hoàn chỉnh gọi là cây chuyển gene.

10.2. Các phương pháp chuyển gene trực tiếp

10.2.1. Nguyên tắc chung

Nguyên tắc chung của các phương pháp này là vận chuyển DNA (ở dạng trần hoặc được bảo vệ bởi một số yếu tố, phụ thuộc vào phương pháp cụ thể) trực tiếp qua các lỗ lớn của thành hoặc/và màng tế bào. Ưu điểm của các phương pháp này là nhanh, hiệu quả cao; tuy nhiên tỉ lệ sống sót của tế bào lại rất thấp, từ đó làm giảm tỉ lệ tái sinh cây con chuyển gene. Một số phương pháp khác được nghiên cứu và phát triển để khắc phục nhược điểm trên, nhưng vẫn không thể đạt được hiệu quả chuyển gene như mong muốn.

10.2.2. Phương pháp đội bom

10.2.2.1. Nguyên lý

Dội bom (particle bombardment) là phương pháp chuyển gene dựa vào áp lực cao do sự di chuyển của các vi hạt (particle) mang gene. Chuyển gene bằng phương pháp dội bom đòi hỏi việc bao phủ các DNA cần chuyển lên bề mặt của các vi hạt mang như vàng hoặc tungsten. Những hạt này sau đó được "bắn" vào mô mục tiêu cố định bằng một nguồn áp lực do khí nén gây ra. Do đó, các loại thiết bị dội bom thường có thể cố định được mô mục tiêu trong quá trình chuyển gene; hướng các hạt mang tới mục tiêu; đồng thời có một cơ chế để điều khiển và định hướng lực cần thiết để tăng tốc các vi hạt.

Dù bằng phương thức hay thiết bị nào đi nữa thì phương pháp dội bom cũng khá gây ảnh hưởng lớn đến các tế bào đích, bởi các DNA là các đại phân tử. Các vi hạt thường có kích thước 0,6 - 1 µm, trong khi kích thước tế bào thực vật trung bình là 20 - 30 µm. Do đó, nếu các hạt này dính với nhau và cùng xâm nhập một tế bào, mức độ tổn thương của tế bào sẽ càng lớn. Vì lý do này nên ứng dụng lớn nhất của dội bom là nghiên cứu các biểu hiện tạm thời (transient expression) của gene được chuyển. Để tối ưu hoá việc chuyển DNA, một số yếu tố sau cần được cân nhắc khi thực hiện: nồng độ DNA, áp lực khí nén, khoảng cách từ điểm tăng tốc các hạt mang tới vị trí của mô đích, tình trạng kết tủa DNA và kích thước của hạt. Việc các mô bị tổn thương có thể được hạn chế bằng các phương pháp sấy khô hoá học hoặc vật lý (hiện tượng co nguyên sinh).

Ngoài ra, một điểm thú vị là các DNA khi được chuyển bằng dội bom có thể ở dạng plasmid. Lúc này, việc tích hợp plasmid vào hệ gene thực vật có thể thông qua tái tổ hợp tương đồng hoặc không tương đồng. Điều này dẫn tới sự tích hợp của nhiều bản sao toàn bộ plasmid. Như vậy, để tăng hiệu quả chuyển gene, hai (hoặc nhiều hơn) đoạn DNA có thể được chuyển cùng một lúc và đồng thời tích hợp vào hệ gene thực vật.

10.2.2.2. Ưu điểm và hạn chế của phương pháp dội bom

Phương pháp dội bom có một số ưu điểm dễ nhận thấy như:

- Có thể áp dụng cho hầu hết các loại mô, tế bào;

- Có thể ứng dụng để chuyển gene vào genome ở nhân cũng như ở lạp thể;

Quy trình chuyển gene nhanh, đơn giản về mặt kỹ thuật, tiết kiệm thời gian nhờ việc cho phép xử lý một lượng mẫu lớn trong thời gian ngắn;

Không đòi hỏi việc chuyển gene vào vi sinh vật trung gian như phương pháp chuyển gene gián tiếp;

- Biểu hiện tạm thời của gene chuyển có thể được quan sát sau vài ngày;

- Không yêu cầu lượng DNA quá nhiều.

Tuy nhiên, phương pháp này cũng có những hạn chế:

- Đòi hỏi về các thiết bị đắt tiền và các vật tư tiêu hao;

- Hiệu quả chuyển gene thấp do số lượng bản sao của gene chuyển không thể dự đoán trước và biểu hiện gene chuyển không ổn định, gây khó khăn trong việc đánh giá kết quả chuyển gene.

- Khá "thô bạo" với các mô/tế bào nhận, do đó ảnh hưởng tới khả năng tái sinh cây hoàn chỉnh sau khi chuyển gene.

10.2.2.3. Các thiết bị dội bom

a. Hệ thống dội bom Biolistic® PDS-1000/He

Hiện nay, thiết bị được sử dụng rộng rãi là PDS-1000/He (particle delivery system). Đầu tiên, các hạt mang microcarrier (kích thước đường kính từ 0,6-1 µm) được bao bọc bởi các phân tử DNA được trải đều ở trên một màng nhựa macrocarrier. Màng nhựa này sẽ được đặt dưới một đĩa nổ (chịu được áp lực trong khoảng từ 30 - 150 atm và được cố định bằng một màng chắn dạng lưới chỉ cho phép các microcarrier đi qua. Phía dưới hệ thống các đĩa/màng này là mô thực vật cần chuyển gene, còn phía trên là một ống tăng tốc. Khi vận hành máy, khí Heli được bơm dần và nén vào ống tăng tốc, tạo một áp lực phá vỡ đĩa nổ, đẩy macrocarrier/microcarrier tới mang chắn, lúc này macrocarrier sẽ được giữ lại trên màng và các microcarrier sẽ đi qua các lỗ lưới, tới mô thực vật phía dưới và chuyển các phân tử DNA vào các tế bào (**Hình 10.1**).

Một số điểm cần lưu ý cho quy trình chuyển gene bằng thiết bị PDS-1000/He như sau (theo hướng dẫn của nhà sản xuất Biorad):

- Chuẩn bị mô mục tiêu: nuôi cấy trong môi trường Murashig và Skoog chứa 2% mannitol trong 7 ngày;

- Chuẩn bị DNA chuyển với nồng độ 10 µg/mL cho mỗi lần chuyển gene;

- Hạt mang microcarrier (đối với mô thực vật): bằng vàng hoặc tungsten, kích thước 1 µm; khối lượng cho 5 lần dội bom là 0,06 - 5 mg. Lưu ý rằng dù các hạt tungsten có giá thành rẻ hơn so với hạt mang bằng vàng, nhưng chúng thường có hình dạng bất thường gây khó khăn trong việc tối ưu hóa điều kiện thực hiện dội bom. Đồng thời hạt tungsten có thể có hại cho một số đối tượng mô/tế bào chuyển gene. Trong khi hạt vàng có hình dạng cầu, đồng đều hơn so với tungsten, nhưng khi được phủ bởi các phân tử DNA, chúng có xu hướng dễ kết tủa hơn;

- Thông số kỹ thuật: áp suất sử dụng để phá vỡ đĩa nổ là 900-1500 psi (khoảng 60-100 atm), áp suất chân không 22 mmHg.

Quy trình chuẩn bị các hạt mang microcarrier vàng (cho 6 lần bắn):

- Cho 30 mg hạt mang vào ống eppendorf 1,5 ml, thêm 1 ml cồn 70% (v/v) và vortex mạnh trong 3-5 phút, sau đó ủ trong 15 phút

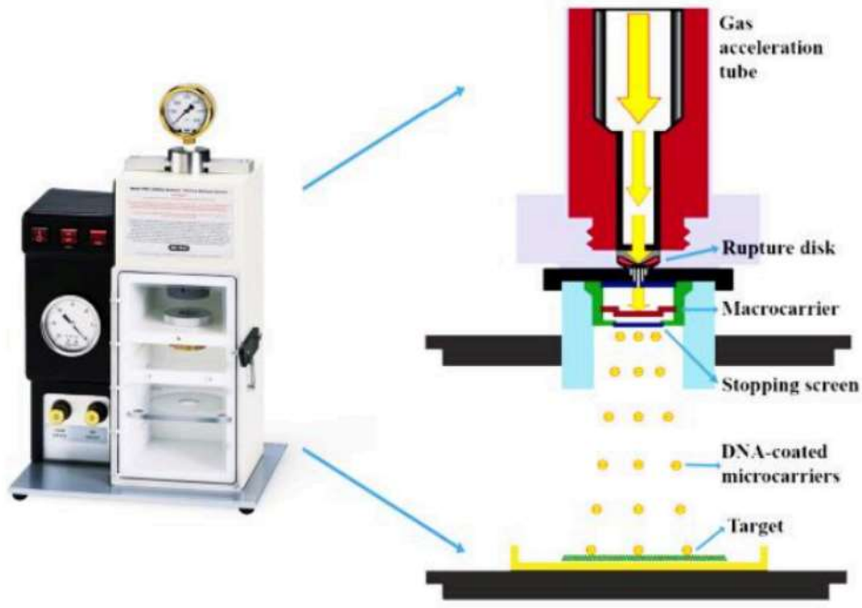
- Ly tâm trong 5 giây và loại bỏ phần dịch nổi

- Lặp lại các bước rửa sau trong 3 lần

- Thêm 1 ml nước cất, vortex mạnh trong 1 phút, ủ trong 1 phút

- Ly tâm nhanh và loại bỏ phần dịch nổi

- Thêm 500 µl glycerol 50% (đã tiệt trùng) để đạt nồng độ hạt mang 60 mg/ml (giả sử không có hao hụt trong quy trình thực hiện).



Hình 10.1. Thiết bị PDS-1000/He và sơ đồ mô tả hoạt động của thiết bị (Ozyigit và Yucebilgili Kurtoglu, 2020)

Chú thích: Gas acceleration tube: ống gia tốc; rupture disk: đĩa nổ; stopping screen: tấm chắn; DNA-coated microcarrier: vi hạt mang được phủ DNA; target: mô mục tiêu)

Quy trình phủ DNA lên các hạt mang microcarrier:

- Trước khi phủ các hạt mang bằng DNA, vortex để trộn đều và loại bỏ kết tụ. Việc này rất quan trọng và trạng thái hạt mang phân bố đều trong dung dịch mà không kết tụ cần được duy trì trong suốt quy trình thực hiện;

- Cho 50 µl dung dịch (tương ứng 3 mg hạt mang) vào ống eppendorf 1,5 mL;

- Thêm vào ống: 5 µl DNA (1 µl/µl), 50 µl $CaCl_2$ 2,5 M và 20 µl dung dịch spermidine 0,1 M. Trộn đều trong 2-3 phút bằng vortex.

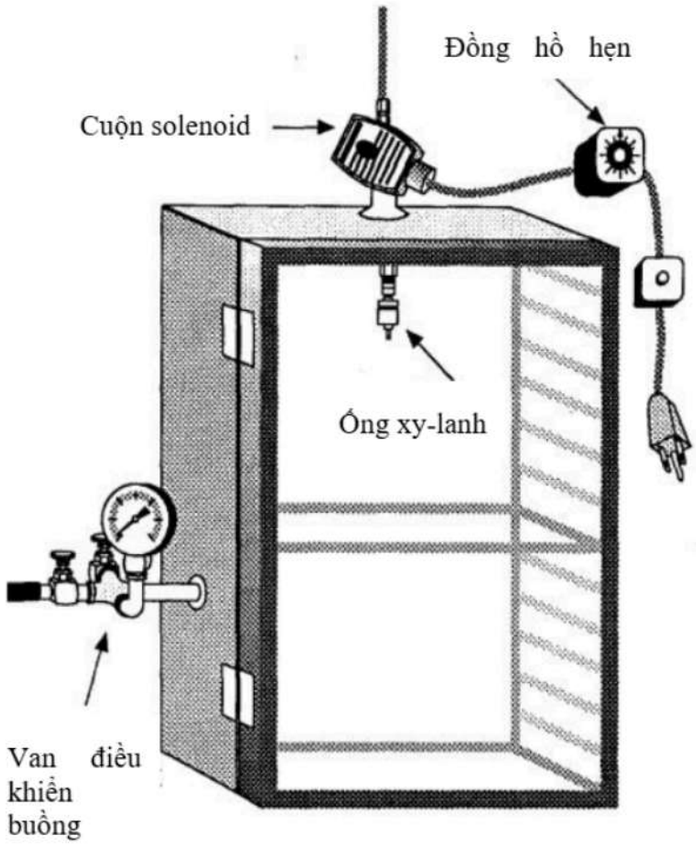
- Để dung dịch nghỉ 1 phút, sau đó ly tâm nhanh trong 2 giây và loại bỏ phần dịch nổi;

- Thêm 140 µl cồn 70%, ly tâm để loại bỏ phần dịch nổi;

- Thêm 140 µl cồn tuyệt đối, ly tâm để loại bỏ phần dịch nổi;

- Thêm 48 µl cồn tuyệt đối, vỗ nhẹ lên thành ống để hòa trộn dung dịch và vortex nhẹ trong 2-3 giây để trộn đều kết tủa.

b. Particle inflow gun



Hình 10.2. Thiết bị particle inflow gun (Finer và cộng sự, 1992)

Một thiết bị khác cũng thường được sử dụng là hệ thống particle inflow gun (PIG). So với PDS-1000/He, các vật tư tiêu hao như đĩa mỏng, màng chắn lưới hay macrocarrier không cần thiết khi sử dụng PIG, từ đó giảm đáng kể chi phí cũng như thời gian thao tác cho mỗi lần bắn gene. Thay vào đó, PIG sử dụng khí Heli ít nén (low-pressure helium) để gia tốc các hạt mang trong chính dòng khí heli đó và hướng đến mô mục tiêu từ một ống xy-lanh được điều khiển bởi một cuộn solenoid có hẹn giờ (**Hình 10.2**).

Việc chuẩn bị các hạt mang trước khi dội bom cũng tương tự như đối với thiết bị Biolistic PDS-1000/He. Khi thực hiện dội bom bằng PIG, 2 µl dung dịch hạt mang (nồng độ 1 µg/µl) được bơm vào ống xy-lanh. Sau khi lắp ống xy-lanh vào hệ thống PIG, các thông số kỹ thuật sau được điều chỉnh: áp suất chân không 28-30 mmHg, áp lực khí He là 40 - 80 Psi.

Có thể thấy cả hai thiết bị trên đều sử dụng khí heli trong cơ chế đẩy các hạt mang, bởi vì đây là khí trơ và có hệ số giãn nở cao. Để hạn chế lực cản không khí lên các hạt mang DNA, hệ thống bắn các hạt thường được đặt trong một buồng chân không (được điều khiển bởi van). Điều này không hoàn toàn bắt buộc nhưng được khuyến khích khi áp dụng các phương pháp bắn gene.

c. Helios® Gene Gun

Thiết bị Helios® Gene Gun (còn gọi súng bắn gene) được thương mại hóa bởi Bio-Rad vào năm 1996. Đây là thiết bị cầm tay, không sử dụng môi trường chân không trong quá trình chuyển hạt mang giống như các thiết bị Biolistic PDS-1000/He hay PIG. Đồng thời, súng bắn gene Helios cũng sử dụng xung heli có thể điều chỉnh được để gia tốc của vi hạt. Các vi hạt phủ DNA sẽ được xử lý với $CaCl_2$ và dung dịch spermidine (tương tự như các thiết bị trên) và trải đều trên môt ống tuýp nhựa. Sau đó ống này được cắt thành từng viên đạn có kích thước khoảng 1 cm và đặt vào khoang chứa (tối đa 12 viên, cho phép dội bom liên tục) của súng bắn gene Helios. Khoang chứa nằm giữa nguồn gas (khí Heli) và nòng bắn. Khi khí Heli giãn nở tạo lực đẩy, viên đạn mang DNA được gia tốc và đẩy khỏi nòng bắn, tiến tới mô/tế bào mục tiêu.

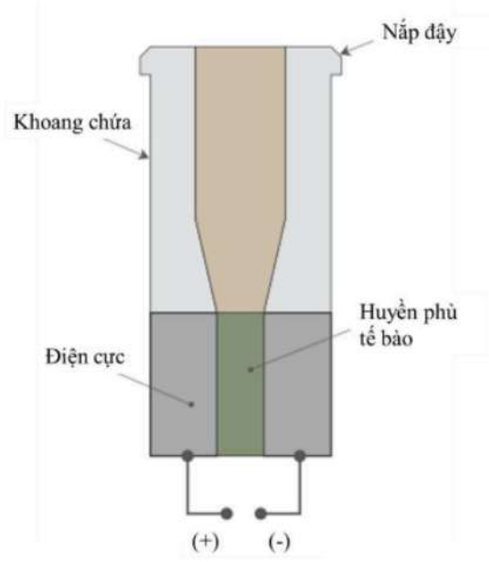
Nhờ đặc điểm gọn nhẹ, súng bắn gene Helios được sử dụng thường xuyên và ứng dụng linh hoạt cho nhiều đối tượng mô/tế bào, thậm chí là đối với cá thể cây nguyên vẹn. Đây là ưu điểm nổi bật nhất so với thiết bị Biolistic PDS-1000/He (hạn chế kích thước của đối tượng chuyển gene do hạn chế kích thước của buồng chứa chân không)

Hình 10.3. Thiết bị Helios Gene Gun (Bio-Rad)

10.2.3. Chuyển gene vào protoplast

Protoplast được tạo thành khi được xử lý tế bào bằng các enzyme như cellulase và pectinase. Từ đó tạo điều kiện dễ dàng cho việc chuyển DNA vào tế bào. Các tế bào sau khi được xử lý bằng enzyme sẽ được bảo quản trong dung dịch muối chứa các chất ổn định thẩm thấu để chúng không bị tổn thương. Để DNA có thể đi qua màng tế bào, có 2 phương pháp được sử dụng rộng rãi là điện biến nạp (electroporation) và sử dụng hóa chất. Các phương pháp này làm màng tế bào tạm thời bất ổn (destabilization) và tạo nên các lỗ trên màng cho phép DNA đi qua.

Đối với điện biến nạp, DNA ngoại lai và tế bào thực vật được hoà trộn trong một dung dịch đệm, sau đó một nguồn điện sẽ tác động lên hỗn hợp này với hiệu điện thế khoảng 25 mV và cường độ dòng điện 0,5 mA (**Hình10.3**). Trong khi đó với hóa biến nạp, hóa chất được sử dụng phổ biến nhất là polyethylene glycol (PEG) sẽ được thêm từ từ, giảm dần nồng độ vào huyền phù gồm protoplast/DNA.



Hình 10.4. Sơ đồ minh hoạ thiết bị điện biến nạp (Rivera và cộng sự, 2012)

Việc lựa chọn tế bào/mô ở bộ phận nào của cây để tạo protoplast phụ thuộc vào mục tiêu khi thiết kế thí nghiệm chuyển gene. Tuy nhiên, nhìn chung hầu như mô nào cũng có thể được sử dụng cho phương pháp này. Nếu ứng dụng để biểu hiện tạm thời gene, những mô sinh trưởng nhanh là thích hợp nhất. Nếu sau khi chuyển gene, có yêu cầu tái sinh thành cây con thì phôi ở dạng huyền phù tế bào thường được ưu tiên sử dụng.

Một điểm cần lưu ý là khả năng sinh sản của cây chuyển gene bắt nguồn từ nuôi cấy protoplast sẽ bị ảnh hưởng vì các biến dị soma. Trường hợp đầu tiên được ghi nhận áp dụng điện biến nạp với protoplast là vào tế bào phôi của lúa. Đối với biến nạp bằng PEG, các thí nghiệm chuyển gene đã thành công với các đối tượng cây ngô, lúa mạch, cây bông.

10.2.4. Các phương pháp khác

Phương pháp dội bom là phương pháp phổ biến nhất trong số các phương pháp chuyển gene trực tiếp. Như đã nhắc tới trên, một số phương pháp khác cũng được nghiên cứu, tiêu biểu có:

- *Điện biến nạp với tế bào nguyên vẹn:* Những thử nghiệm điện biến nạp với tế bào ngô nguyên vẹn (chưa xử lý để loại bỏ thành tế bào), dù có mang lại kết quả chuyển gene thành công nhưng không thực sự đáng tin cậy.

- *Silicon carbide whisker:* những vi sợi dài, mảnh (rộng 1 µm, dài từ 20-30 µm) được thêm vào hỗn hợp tế bào thực vật và DNA, sau đó trộn đều bằng máy vortex. Kết quả chuyển gene thành công có thể được giải thích nhờ những vi sợi xuyên qua thành tế bào, hỗ trợ DNA xâm nhập vào tế bào. Tuy vậy, quy trình này gây tổn hại tế bào đáng kể và do đó khó tiếp tục công đoạn nuôi cấy mô để tái sinh cây chuyển gene.

- *Nanofiber array:* các tế bào được "ép" lên các chip silica có gắn các phân tử DNA bằng lực li tâm. Phương pháp này được ghi nhận là hiệu quả để chuyển gene vào tế bào động vật hơn so với tế bào thực vật.

- *Chuyển gene bằng ống phấn:* những thử nghiệm chuyển gene bằng ống phấn đạt hiệu quả <1% các tế bào có chứa DNA được chuyển, và kết quả này không thể lặp lại được trong các thử nghiệm tiếp sau đó.

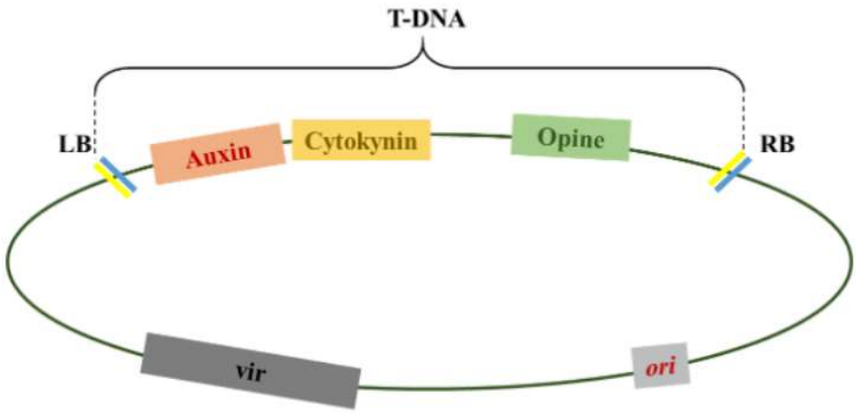
10.3. Chuyển gene thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

10.3.1. Biến nạp vật liệu di truyền vào thực vật của Agrobacterium trong tự nhiên

Biến nạp bằng vi khuẩn *Agrobacterium* đã và đang được sử dụng phổ biến nhất cho việc tạo ra các loài thực vật biến đổi gene; trong đó, *A. tumefaciens* và *A. rhizogenes* được ứng dụng nhiều nhất. *A. tumefaciens* là vi khuẩn đất, Gram âm, gây khối u ở thực vật (crown gall disease) nhờ Ti plasmid. Tương tự đối với *A. rhizogenes* chứa Ri (root-inducing) plasmid, gây ra hiện tượng lông tơ ở rễ. Trên các plasmid này chứa đoạn T - DNA, chứa ít nhất 2 loại gene: loại gene gây ung thư (*onc*) mã hoá cho các chất điều hoà sinh trưởng để kích thích phân chia tế bào, dẫn tới hình thành khối u/lông tơ ở rễ; và loại gene có vai trò trong quá trình sản sinh opine (được chuyển hoá bởi vi khuẩn). Ở phía ngoài cùng của T - DNA là các đoạn lặp LB và RB (bờ trái và bờ phải) dài khoảng 25 bp. Chúng là các tín hiệu dạng *cis* để T - DNA có thể dung hợp vào tế bào thực vật. Trong quá trình vận chuyển, T - DNA sẽ không được biểu hiện hay có bất kỳ vai trò nào. Do đó, nếu thay thế các gene *onc* trên đoạn T - DNA giữa LB và RB bằng các gene quan tâm thì khả năng tạo khối u hay lông tơ ở rễ của *Agrobacterium* sẽ bị "vô hiệu hoá" và các gene quan tâm sẽ được chuyển vào tế bào thực vật.

Ngoài đoạn T - DNA, ở trên Ti plasmid còn chứa vùng *vir* (khoảng 30 Kb), là các tín hiệu dạng *trans* cho quá trình chuyển gene, gồm các operon (virA, virB, virC, virD, virE, virF, virG và virH). Các gene *vir* còn được tìm thấy ở trên bộ nhiễm sắc thể vi

khuẩn của *Agrobacterium*, gồm các operon *chvA*, *chvB* và *chvFI*, có liên quan đến quá trình vận chuyển T - DNA.



Hình 10.5. Minh họa các thành phần tiêu biểu của Ti plasmid (không theo tỉ lệ chính xác)

Chú thích: LB: bờ trái; RB: bờ phải; Auxin, cytokynin: các gene oncogenic mã hóa cho các chất điều hoà sinh trưởng thực vật; Opine: gene tham gia vào sinh tổng hợp các opine; ori: trình tự khởi đầu sao chép; vir: các gene *vir*

Trong tự nhiên, quá trình chuyển T - DNA vào tế bào và tích hợp vào hệ gene thực vật gồm nhiều bước, có thể phân thành các giai đoạn chính như sau:

- *Hình thành khuẩn lạc:*

Đây là giai đoạn đầu tiên của quá trình chuyển T - DNA, khi *A. tumegaciens* tạo các khuẩn lạc và bám vào bề mặt của tế bào thực vật (vật chủ).

- *Kích thích hệ thống gây bệnh của vi khuẩn:*

VirA, virG: các operon được biểu hiện liên tục, mã hoá cho một hệ thống có chức năng kích hoạt phiên mã các gene vir khác. VirA protein là một protein cảm ứng, có thể nhận biết các tín hiệu từ những phân tử hợp chất phenol (ví dụ: acetosyringone) và một số các loại đường đơn khác được tiết ra từ vết thương ở cây. Trong khi đó, virG protein ở trong tế bào chất, hoạt động như một yếu tố phiên mã và điều hoà biểu hiện của các gene *vir* khác bằng phản ứng phosphoryl hoá. Ngoài các hợp chất tiết ra từ cây, giai đoạn kích thích này còn chịu sự ảnh hưởng của các yếu tố nhiệt độ và pH môi trường.

- *Hình thành phức hợp T – DNA:*

Sau khi được cảm ứng và bắt đầu biểu hiện, protein của các gene *vir* sẽ hoạt động và hình thành phức hợp T - DNA, là dạng sẽ được chuyển vào tế bào thực vật

Các protein virD1 và virD2 theo thứ tự nhận biết và cắt đoạn T - DNA ở 2 vị trí LB, RB (chỉ cắt 1 mạch đơn, *nick*). VirD2 gắn ở đầu 5' của đoạn T - DNA mạch đơn có chức năng ngăn cản quá trình exonucleolysis và định hướng cho đoạn T - DNA về phía nhân tế bào thực vật bằng cách nhận biết các tín hiệu vị trí nhân (nuclear localization signals, NLS).

- Chuyển đoạn T – DNA:

Các protein của operon virB đóng vai trò như những kênh vận chuyển xuyên màng cho phép phức hợp T- DNA/VirD2 đi qua. Phức hợp T-DNA sau khi vượt qua thành và màng tế bào, tiến vào môi trường nội bào sẽ được bảo vệ bởi các protein VirE2 (kích thước khoảng 69 kDa) khỏi các enzyme nuclease, quá trình này đồng thời kéo dãn chiều dài, thu hẹp đường kính của phức hợp. VirE2 còn chứa các tín hiệu nhận biết VirD2 protein và vị trí của nhân tế bào thực vật (NLS). Trên thực tế, việc vận chuyển phức hợp T - DNA có gắn VirE2 protein không thực sự cần thiết khi tiến vào tế bào thực vật, do đó các VirE2 protein sẽ được vận chuyển độc lập (thông qua sự hỗ trợ của VirE1 protein), còn sợi T - DNA mạch đơn tiến vào môi trường nội bào ở dạng phức hợp với VirD2.

Một số protein của các vir operon khác cũng có vai trò nhất định trong giai đoạn này như virF, virH.

- Dung hợp T - DNA vào hệ gene:

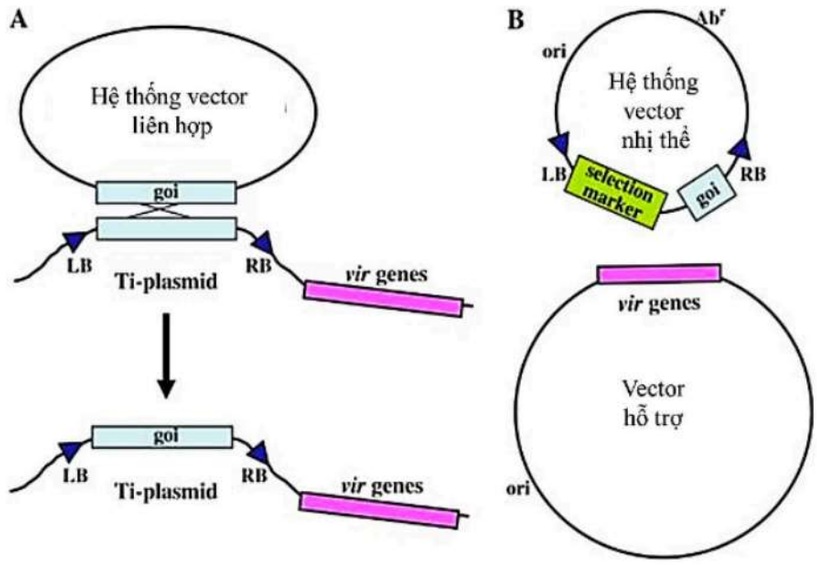
Sau khi xâm nhập vào tế bào thực vật, phức hợp T - DNA sẽ nhắm tới nhân tế bào để tiếp cận với genome thực vật. Lúc này, các tín hiệu NLS trên các protein VirD2, VirE2 hoạt động. VirE2 gắn vào yếu tố phiên mã bZIP của protein tương tác với VirE2 1 (VIP1), VIP1 hỗ trợ phức hợp T - DNA kết nối với các nucleosome. Khi phức hợp T - DNA đến được nhân tế bào, các protein đi kèm sẽ được tháo ra, để lộ sợi T-DNA đơn. Cơ chế tích hợp sợi T - DNA vào hệ gene vẫn chưa được hiểu rõ hoàn toàn, có thể là DNA polymerase của vật chủ sẽ sao chép sợi T - DNA để tạo thành dạng mạch đôi, sau đó kết nối ngẫu nhiên vào vị trí đứt trên DNA thực vật thông qua cơ chế chỉnh sửa nối các đoạn không tương đồng.

10.3.2. Các cải tiến ở vi khuẩn Agrobacterium cho mục đích chuyển gene

Để việc chuyển gene hiệu quả, hệ thống di truyền của *Agrobacterium* cũng đã được cải tiến vì: (1) Ti plasmid có kích thước lớn, khoảng hơn 200 Kb, do đó rất khó để chèn đoạn gene quan tâm; (2) *Agrobacterium* chỉ có thể tấn công và chuyển gene vào một số loài thực vật nhất định, trong đó các loài thuộc họ Poaceae và các cây một lá mầm được cho là gần như không có phản ứng với *Agrobacterium* và phương pháp biến nạp sử dụng loài vi khuẩn này.

10.3.2.1. Hệ thống vector

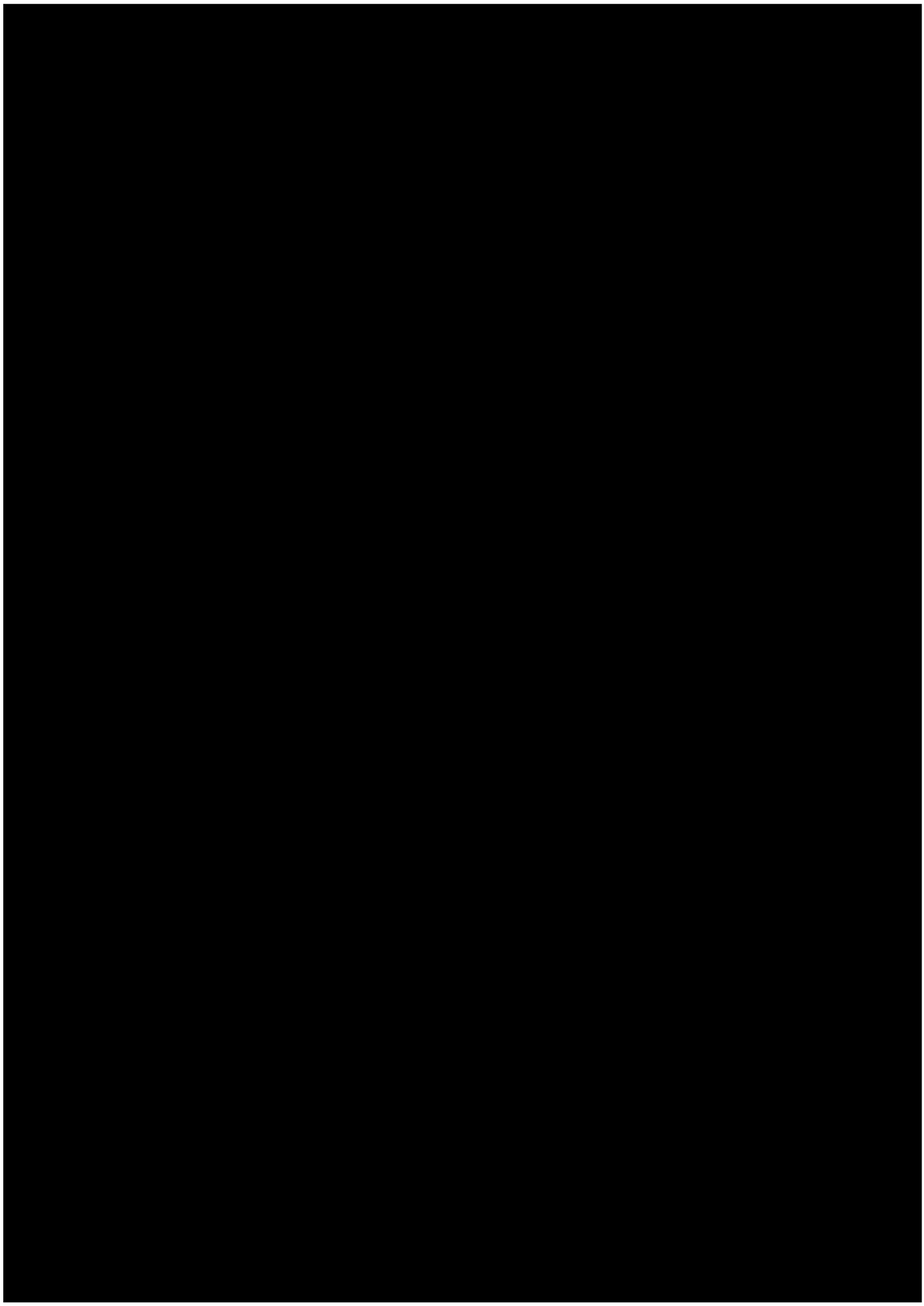
Để giải quyết hạn chế do kích thước lớn của Ti plasmid, giúp việc chuyển DNA được đơn giản hơn, hệ thống vector nhị thể (binary vector) được phát triển. Sơ đồ ở **Hình 10.6** thể hiện hệ thống vector liên hợp và hệ thống vector nhị thể để tích hợp gene mục tiêu vào hệ gene thực vật thông qua *Agrobacterium*.

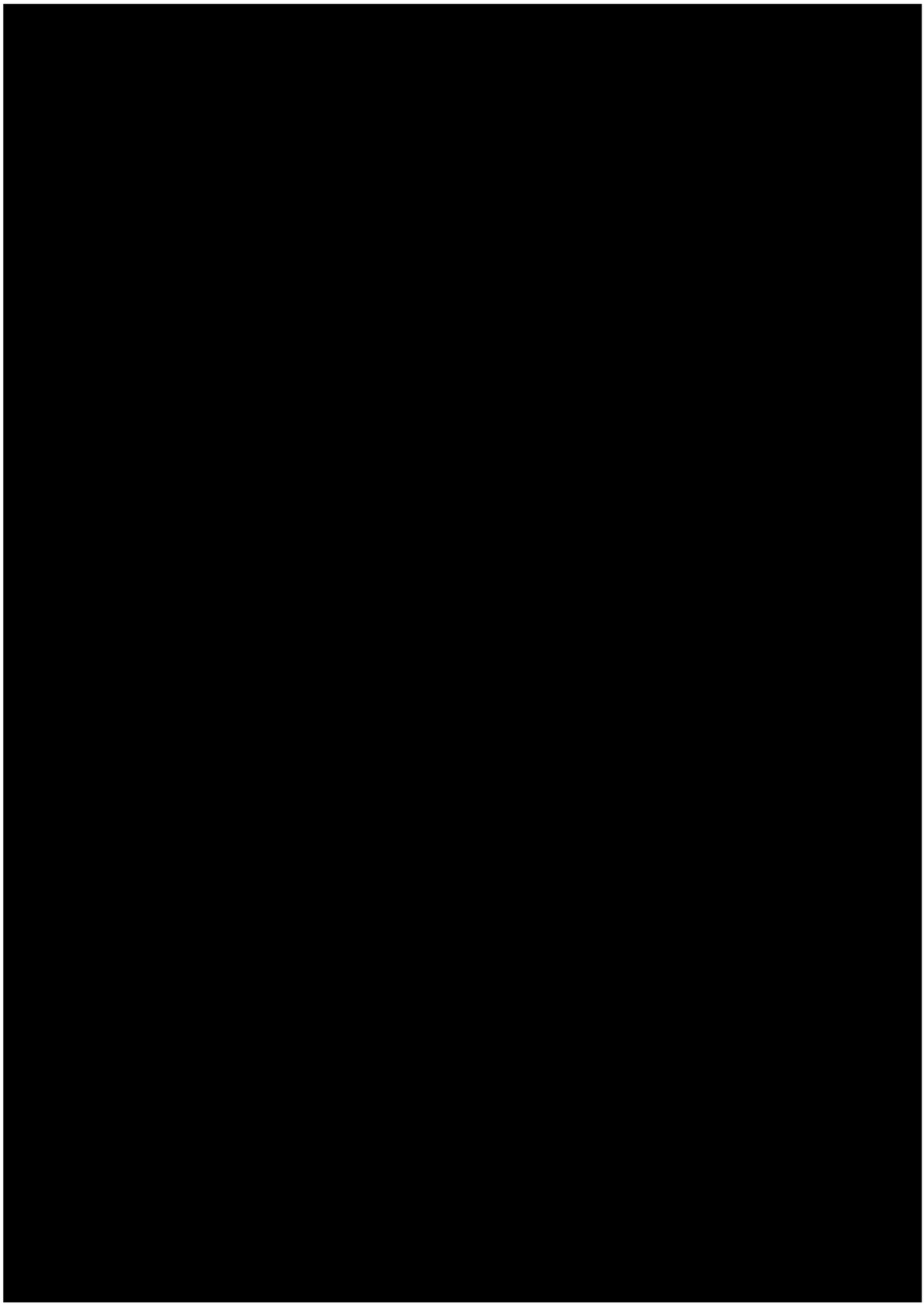


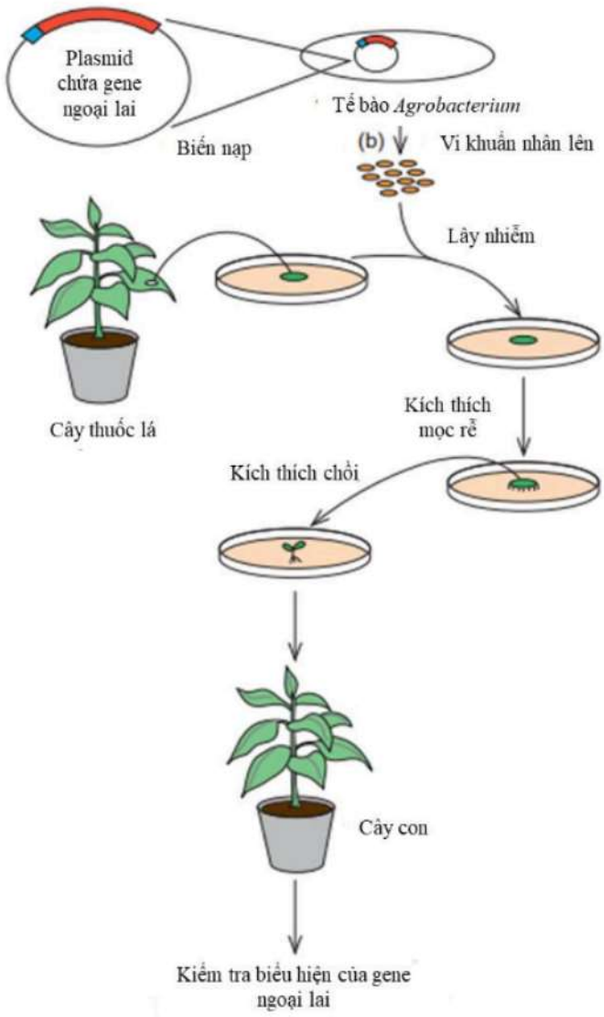
Hình 10.6. Chuyển đoạn gene quan tâm bằng hệ thống vector trao đổi (A) và hệ thống vector nhị phân (B) (Lee và Gelvin, 2008)

Chú thích: goi: gene quan tâm; LB: bờ trái; RB: bờ phải; selection marker: gene đánh dấu; ori: điểm khởi đầu nhân đôi; Ab^r: gene kháng kháng sinh

Đối với hệ thống vector liên hợp, gene mục tiêu được chuyển vào giữa hai vị trí LB và RB trên Ti plasmid (chưa hoặc đã bất hoạt) thông qua tái tổ hợp tương đồng. Tiếp theo đó, Ti plasmid chứa gene quan tâm hoạt động để chuyển đoạn gene này vào tế bào thực vật. Đối với hệ vector nhị thể, gene quan tâm được giữ lại ở vùng T - DNA của một vector nhị thể, trong khi các gene *vir* nằm trên một vector khác (vector hỗ trợ). Các gene





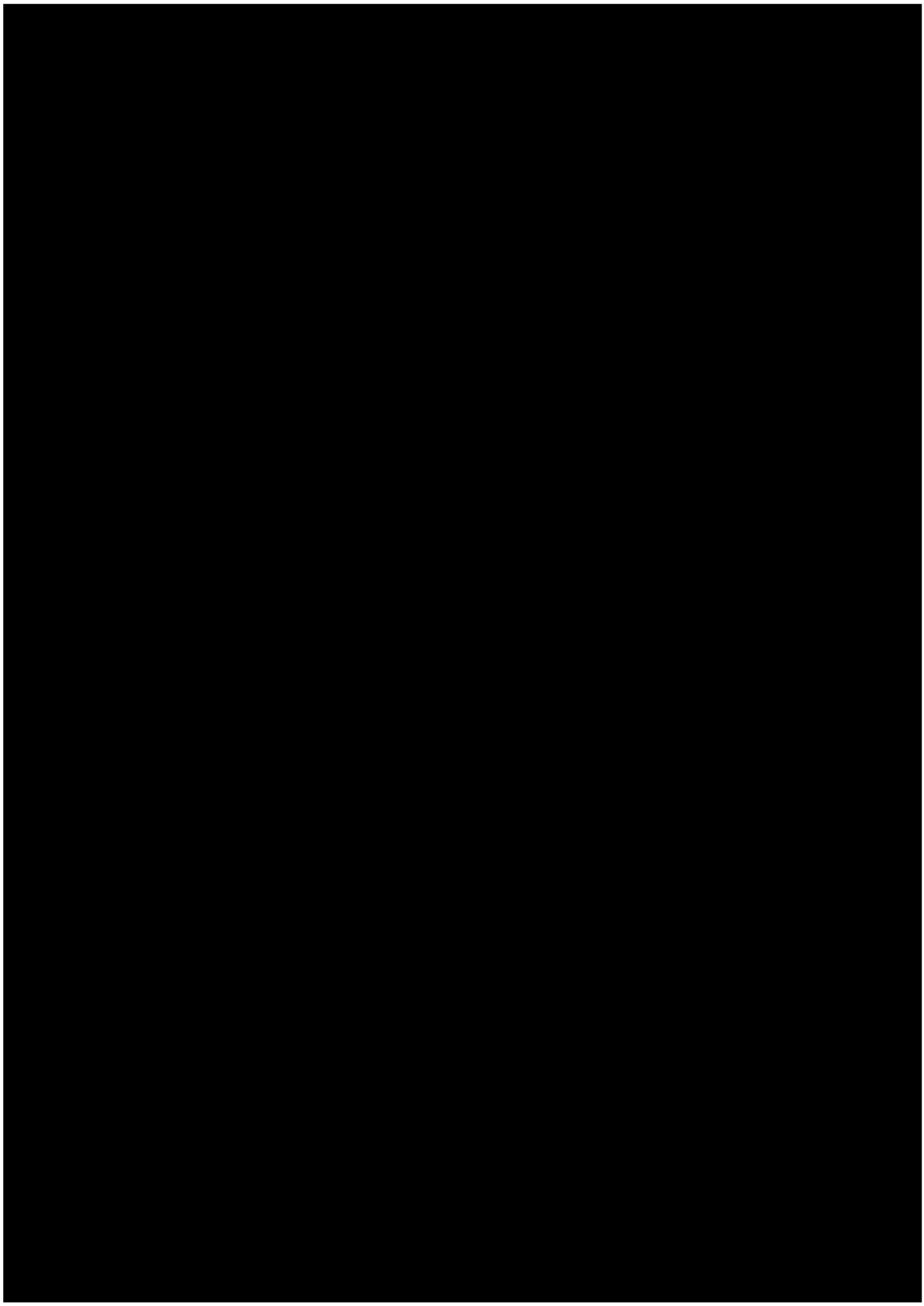


Hình 10.8. Sơ đồ lây nhiễm *Agrobacterium* với mô lá của cây thuốc lá (Weaver, 2021)

10.3.4. Chuyển gene in planta

Chuyển gene *in planta* nghĩa là chuyển gene trực tiếp vào một cây hoàn chỉnh, không thông qua các giai đoạn nuôi cấy mô tế bào thực vật. Phương pháp này có ưu điểm là tạo ra các cá thể chuyển gene nhanh chóng và hạn chế việc biến dị soma (xảy ra trong quá trình nuôi cấy mô tế bào). Các kĩ thuật chuyển gene *in planta* gồm có agroinoculation và agroinfiltration.

Đối với agroinoculation, vi khuẩn *Agrobacterium* mang gene quan tâm sẽ được lây nhiễm trên bề mặt của cây (thay vì mô thực vật) bằng các dụng cụ như vòng nuôi cấy, tăm hoặc nhúng trực tiếp một phần của cây vào môi trường nuôi cấy lỏng chứa



(không được bảo vệ), khác với genome thực vật được bảo vệ bởi các protein, khó có thể dự đoán được điều gì sẽ xảy ra với các DNA ngoại lai này. Đối với phương pháp chuyển gene thông qua *Agrobacterium,* đoạn DNA được bảo vệ bởi các protein và được chuyển vào nhân tế bào. Dù bằng phương pháp nào thì mỗi phương pháp đề có ưu nhược điểm riêng, từ đó ảnh hưởng đến kết quả của việc chuyển gene.

b. Mô nhận gene

Các mô nhận gene chuyển cần được lựa chọn sao cho thuận tiện trong quá trình lấy mẫu, đủ độ bền để trải qua quy trình chuyển gene và đồng thời có khả năng phân chia và phát triển thành cây hoàn chỉnh. Lý tưởng nhất là tế bào trứng và hạt phấn, tuy nhiên lại ít có thử nghiệm nào thành công đối với các đối tượng tế bào này (trừ một số thí nghiệm trên *Arabidopsis*). Đồng thời, việc chuyển gene vào hợp tử lại gặp nhiều khó khăn. Trong khi đó, chuyển gene vào các tế bào của phôi hay mô phân sinh thường cho ra kết quả thể khảm.

c. Chọn lọc mẫu mô/tế bào chuyển gene thành công:

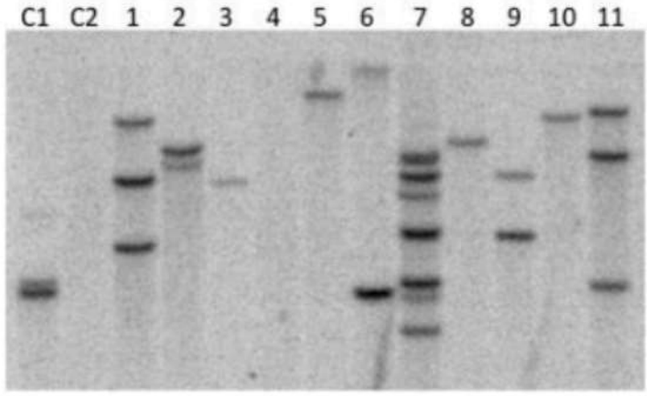
Để đảm bảo chính xác, tránh sai sót hoặc hiểu sai các dấu hiệu, các mẫu chuyển gene thường được phân tích qua nhiều cấp độ: sự hiện diện của DNA, khả năng hoạt động của gene và sự thay đổi trong kiểu hình của mô hoặc cây chuyển gene.

10.4.2. Phân tích sự có mặt của DNA ngoại lai

Để xác nhận sự có mặt của đoạn DNA được chuyển, phương pháp đơn giản nhất là phản ứng PCR với các đoạn mồi được thiết kế phù hợp. Sản phẩm PCR sau đó sẽ được phân tích bằng điện di gel hoặc giải trình tự. Cần lưu ý rằng dù PCR chỉ là công cụ đánh giá sơ bộ sự hiện diện của DNA, đây vẫn là công cụ hữu dụng bởi khả năng phát hiện DNA ở nồng độ cực kỳ thấp (hàm lượng từ 20 pg tới 10 ng), tương đương với khả năng phát hiện một hạt giống chuyển gene trong 1,000 tới 10,000 hạt giống thường (Luthy, 1999). Tuy nhiên vấn đề nhiễm mẫu cần được hạn chế tối đa trước khi tiến hành phản ứng, vì các tạp chất tồn tại sau khi tách chiết DNA như protein, polysaccharide hay polyphenol là những chất ngăn cản quá trình gắn đoạn mồi vào DNA khuôn mẫu.

Dù vậy, phương pháp tối ưu nhất để xác nhận sự hiện diện của DNA ngoại lai là lai Southern. Nếu PCR chỉ có thể xác nhận sự tồn tại của DNA ngoại lai thì kết quả lai Southern là minh chứng cho sự tích hợp của DNA vào genome, đồng thời cung cấp

thông tin về số lượng bản sao của DNA cũng như số vị trí mà DNA đã tích hợp trên genome thực vật. Bên cạnh đó, việc sử dụng các enzyme cắt giới hạn thích hợp để tăng độ chính xác cho kết quả phép lai là rất quan trọng. Ví dụ, nếu thiết kế đoạn T - DNA có chứa trình tự cắt giới hạn của enzyme *Sac*I, thì sau khi tách chiết DNA tổng của cây mẫu, ta sử dụng enzyme này để phân nhỏ genome của cây. Tiếp đó, thực hiện phép lai Southern với mẫu dò nhận biết trình tự của T - DNA sẽ cho kết quả số lượng bản sao gene chuyển được tích hợp vào genome.



Hình 10.9. Kết quả lai Southern với số band tương ứng với số lượng bản sao gene ngoại lai tích hợp vào hệ gene (Lino và cộng sự, 2012)

Chú thích: C1: mẫu cây chuyển gene, đối chứng dương; C2: mẫu cây không chuyển gene, đối chứng âm; 1-11: các mẫu cây thí nghiệm được phân tích

10.4.3. Phân tích biểu hiện của gene chuyển

Việc một gene chuyển có biểu hiện được hay không phụ thuộc vào trình tự đoạn promoter được thêm vào trong lúc thiết kế đoạn DNA chuyển. Thông thường, một promoter cơ định như CaMV35S sẽ được sử dụng, tuy nhiên điều này không đảm bảo biểu hiện của gene quan tâm. Kiểm tra biểu hiện của gene được thực hiện ở mức độ RNA và mức độ protein cùng các thay đổi trong tính trạng cây chuyển gene. Dù không nhất thiết phải xác nhận tất cả các mức độ trên, tuy nhiên vẫn nên có sự kết hợp hợp lý các phương pháp phân tích.

10.4.3.1. Biểu hiện tạm thời của gene chuyển

Biểu hiện tạm thời của gene nghĩa là đoạn gene được chuyển chỉ biểu hiện trong một khoảng thời gian ngắn sau khi biến nạp. Thông thường, các gene đánh dấu chỉ thị có khả năng chuyển hoá một cơ chất không màu thành có màu sẽ được sử dụng, phổ

biến nhất là β-glucuronidase (GUS) từ *E. coli* (chuyển cơ chất không màu thành màu xanh dương) và green fluorescent protein (GFP) (phát quang màu xanh khi được kích thích bởi tia UV cường độ cao hoặc ánh sáng xanh). Nghiên cứu biểu hiện tạm thời của gene có vai trò nhất định trong việc phát triển và hoàn thiện các quy trình biến nạp, do đó dù không quá phổ biến, nhưng chúng vẫn cần thiết trong giai đoạn đầu của các thí nghiệm chuyển DNA.

10.4.3.2. Kiểm tra biểu hiện gene chuyển ở mức độ RNA

Lai Northern hoặc RT - PCR là các kỹ thuật được áp dụng để phân tích RNA. Tương tự như với các thí nghiệm trên DNA, kích thước và độ đậm/nhạt của band được phân tích và từ đó diễn giải kết quả của quy trình chuyển gene. Để phân tích RNA, trước hết cần đảm bảo RNA tổng tách chiết từ mẫu thực vật được tinh sạch và vẫn còn nguyên vẹn do RNA tương đối không ổn định, dễ bị phân hủy. Ngoài ra, trong quá trình phân tích RNA trên gel điện di, cần thêm các chất ngăn cản sự hình thành các cấu trúc thứ cấp của RNA như formaldehyde hay glyoxal.

10.4.3. Kiểm tra biểu hiện gene chuyển ở mức độ protein và sự thay đổi tính trạng của cây chuyển gene

Nếu đoạn DNA được chuyển có chứa gene đánh dấu chỉ thị, việc xác nhận biểu hiện của gene được tiến hành theo quy trình tương ứng để nhận biết gene chỉ thị (**Mục 9.4.5**). Đối với các gene liên quan đến khả năng kháng các loại thuốc trừ sâu hay các tác nhân sinh học, ta có thể kiểm tra biểu hiện gene một cách đơn giản bằng các xét nghiệm sinh học (ví dụ: kỹ thuật ELISA). Tuy nhiên, kết quả của các xét nghiệm này không phải là bằng chứng thuyết phục cho việc tích hợp của DNA ngoại lai vào genome thực vật.

Phương pháp lai Western được sử dụng để phân tích sự tồn tại của protein của gene chuyển. Protein tổng được phân tích trên gel SDS-PAGE và chuyển qua màng lai. Mẫu dò trong phản ứng lai Western là các kháng thể có thể liên kết với chuỗi polypeptide bằng liên kết hydro.

10.4.4. Di truyền của gene chuyển

Khi gene chuyển được kỳ vọng sẽ biểu hiện thành kiểu hình mới thì bất cứ sự thay đổi nào ở kiểu hình của cây cũng cần được phân tích rõ ràng để xác định thay đổi đó có phải do sự hiện diện và biểu hiện của gene chuyển hay không. Đối với thế hệ cây chuyển

gene đầu tiên, các cây con thường chứa gene chuyển và mang kiểu gene dị hợp. Lý giải cho điều này là dù có thể có nhiều bản sao của gene chuyển được tích hợp vào hệ gene thực vật, nhưng chúng thường tích hợp vào cùng một vị trí và do đó chỉ hoạt động như một gene đơn lẻ ở kiểu gene dị hợp.

Thông thường, di truyền của gene chuyển vẫn tuân theo các định luật của Mendel. Do đó, ở thế hệ tiếp theo (sau khi tự thụ thế hệ chuyển gene đầu tiên), kiểu gene phân ly theo tỉ lệ 1:2:1, sẽ có 25% cây con không chứa gene chuyển, 50% là cây chuyển gene dị hợp và 25% là cây chuyển gene đồng hợp; đồng thời tỉ lệ kiểu hình biểu hiện sẽ là 75% mang kiểu hình của gene chuyển (3:1). Nếu một tỉ lệ nào khác được phát hiện, cần cân nhắc tới số lượng bản sao và vị trí mà gene ngoại lai tích hợp vào hệ gene thực vật.

- Số lượng bản sao:

Thông thường, đối với chuyển gene thông qua *Agrobacterium,* từ 1 - 2 bản sao của gene quan tâm sẽ được chuyển vào hệ gene, còn nếu phương pháp dội bom được sử dụng, số lượng bản sao này không thể dự đoán được.

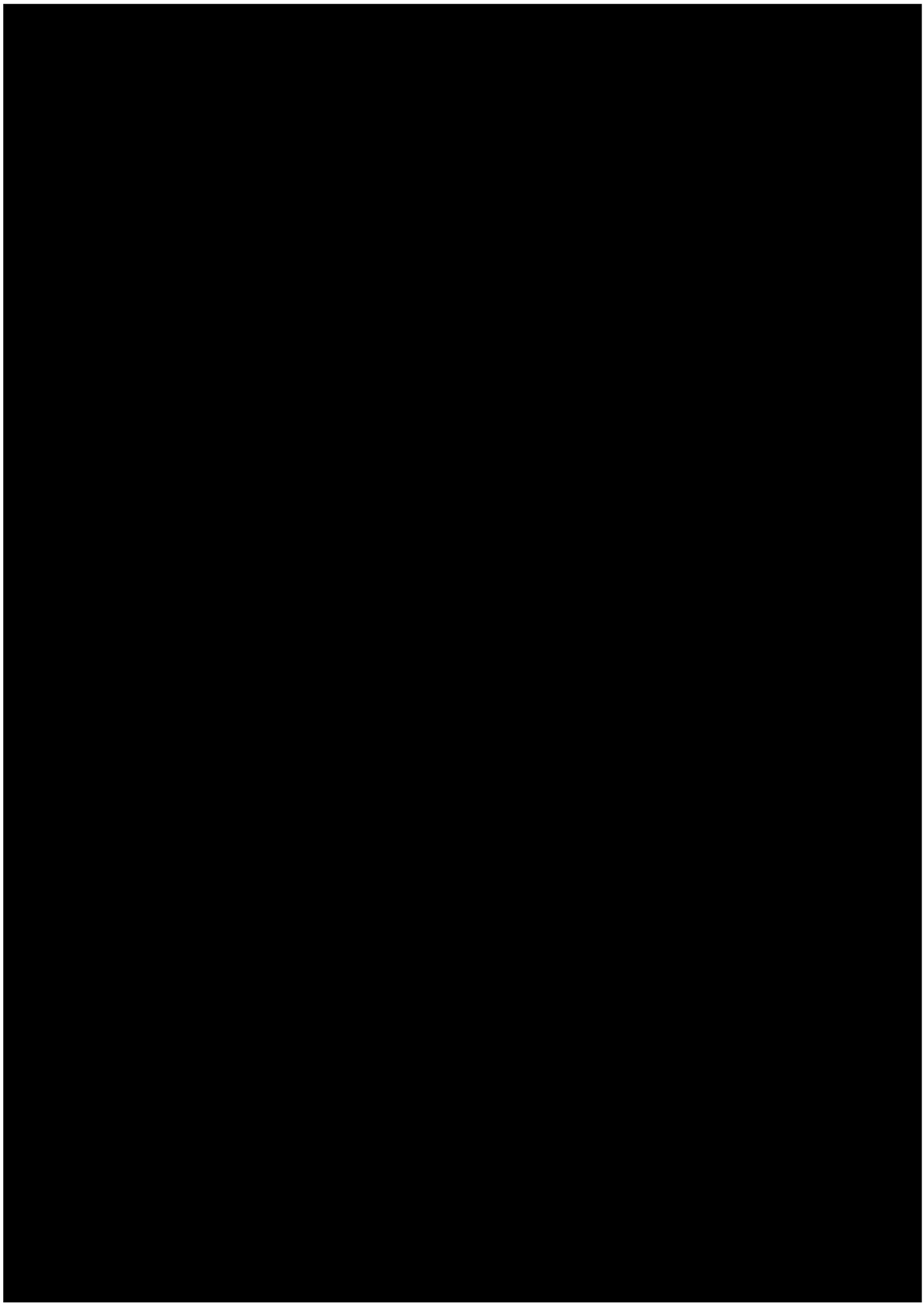
- Vị trí của tích hợp vào hệ gene:

Gene chuyển chèn vào một đoạn gene khác và bất hoạt gene đó. Trường hợp gene này là một gene liên quan tới sự sống sót hay sinh trưởng của cây, kết quả sẽ gây ra hiện tượng cây chết; nếu gene bị bất hoạt là gene liên quan tới khả năng sinh sản của cây, kết quả cây chuyển gene sẽ là cây bất dục.

Gene chuyển chèn vào vị trí không được biểu hiện trên nhiễm sắc thể khiến gene không thể hiện ở kiểu hình hoặc thể hiện các tính trạng không mong muốn dù cây được chuyển gene thành công.

10.4.4. Tái sinh cây chuyển gene

Để tái sinh một cây chuyển gene, một tế bào nhận được DNA phải có khả năng hoặc tạo thành cây con hoặc góp phần tạo nên một hợp tử (hạt phấn hoặc trứng), từ đó trải qua các kích thích phù hợp để tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Trong hầu hết các trường hợp, chuyển gene vào thực vật phụ thuộc phần lớn vào khả năng tái sinh cây bằng các phương pháp nuôi cấy mô.



CHƯƠNG 11

ĐÁNH GIÁ THỰC NGHIỆM, ỨNG DỤNG VÀ VẤN ĐỀ AN TOÀN SINH HỌC CÂY TRỒNG CHUYỂN GENE

TÓM TẮT CHƯƠNG

Cây trồng chuyển gene cần được đánh giá thực nghiệm qua giai đoạn thích nghi và phân tích các thế hệ cây con. Ứng dụng chuyển gene vào thực vật để cải thiện giống cây trồng hướng tới các mục tiêu như kháng các tác nhân sinh học, môi trường, cải thiện năng suất, chất lượng sản phẩm,... Để hạn chế tối đa những rủi ro tiềm ẩn của các giống cây trồng chuyển gene, quá trình phân tích rủi ro gồm đánh giá rủi ro, quản lý rủi ro và giao tiếp rủi ro của thực vật biến đổi gene được tiến hành dựa theo những nguyên tắc cơ bản đã được quy định. Nội dung chương này đề cập đến các vấn đề liên quan thực nghiệm cây biến đổi gene, các ứng dụng và vấn đề an toàn sinh học.

11.1. Đánh giá thực nghiệm cây trồng chuyển gene

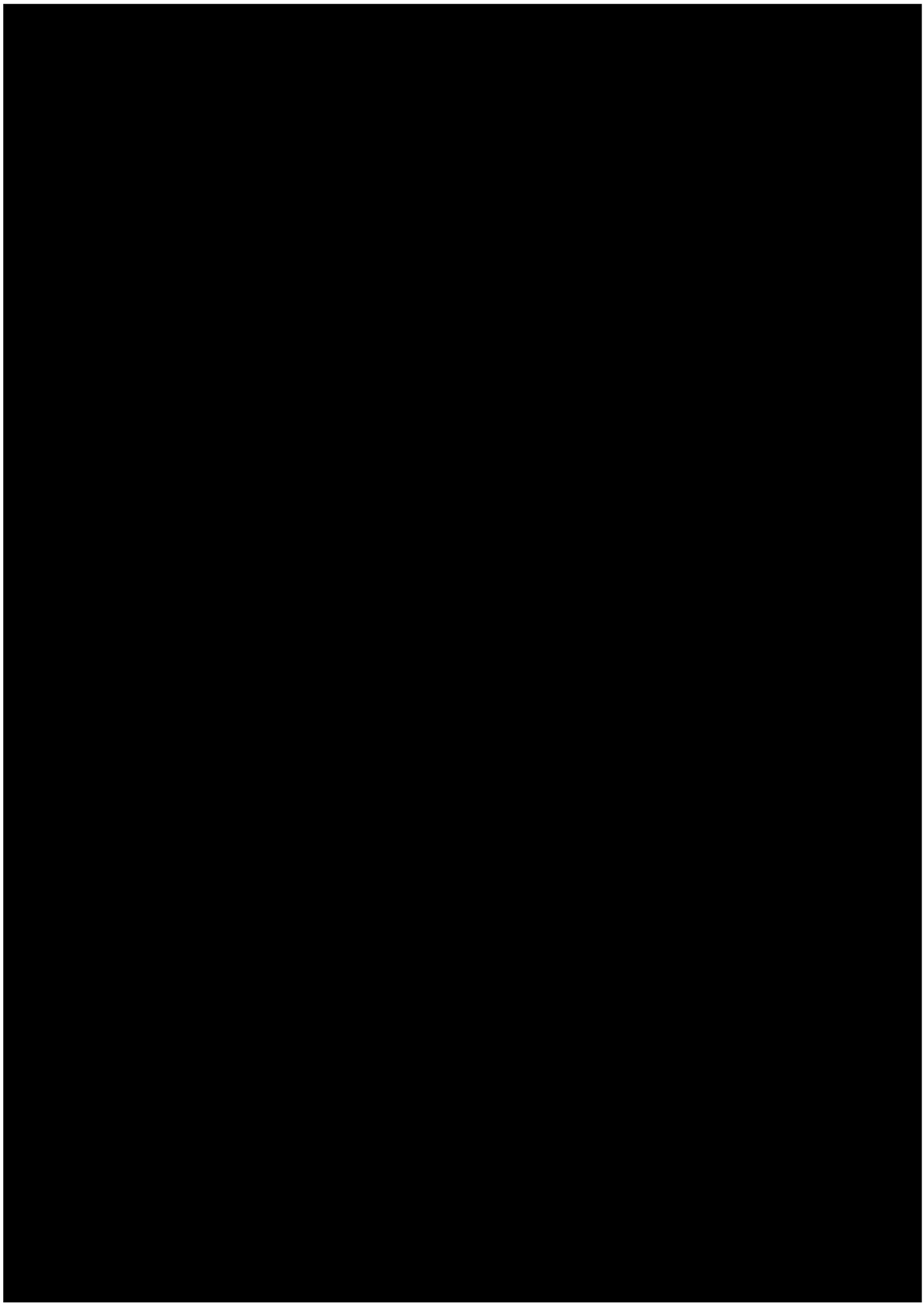
Sau khi xác định việc chuyển gene và tái sinh cây chuyển gene thông qua các quy trình nuôi cấy mô/tế bào thành công, các bước tiếp theo cần thực hiện để tạo ra giống cây trồng chuyển gene là đánh giá sự thích nghi của cây trồng trong điều kiện tự nhiên và sự duy trì tính trạng mới qua các thế hệ cây con.

Giai đoạn thích nghi: có thể bắt đầu khi hệ rễ bắt đầu phát triển mạnh. Cây chuyển gene T_0 được đưa ra trồng trực tiếp trong đất hoặc có trộn lẫn một phần môi trường nuôi cấy, dưới điều kiện môi trường được kiểm soát (ví dụ: nhà kính).

- Giai đoạn trồng cây và tự thụ của thế hệ T_0: Quá trình tự thụ này được thực hiện trong nhà kính.

- Phân tích thế hệ T_1: phân tích các biểu hiện kiểu hình, sự thay đổi về hình thái hay sinh lý của cây để xác nhận biểu hiện của gene chuyển.

Những thông tin thu được trong quá trình đánh giá kết quả chuyển gene (**Mục 9.4**) như số bản sao của gene mục tiêu dung hợp trong hệ gene, mức độ và vị trí cơ quan biểu



pháp truyền thống và (3) việc chuyển tính trạng mong muốn vào giống cây đích là rất khó khăn hoặc mất rất nhiều thời gian nếu với nhân giống truyền thống.

Bảng 11.1. Tình hình cây trồng biến đổi gene trên thế giới năm 2019 (ISAAA, 2019)

STT	Cây trồng biến đổi gene	Quốc gia/Vùng lãnh thổ	Diện tích	
			(Triệu ha)	%
1	Đậu nành	Mĩ, Canada, Singapore, Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Đài Loan, Việt Nam, Malaysia, Úc, Brazil, Nga, Thổ Nhĩ Kỳ,…	91,9	48,2
2	Ngô	Mĩ, Brazil, Argentina, Nam Phi, Canada, Phillipines, Paraguay, Uruguay, Tây Ban Nha, Việt Nam,…	60,9	32
3	Bông	Mĩ, Trung Quốc, Pakistan, Brazil, Argentina, Myanmar, Sudan, Úc, Nam Phi, Columbia,…	25,7	13,5
4	Cải dầu	Mĩ, Canada, Úc, Chile	10,1	5,3
5	Các loài thực vật khác (củ cải đường, khoai tây, táo, bí, đu đủ, cà tím)		1,8	1
	Tổng cộng		190,4	100

Nhìn chung, có những ứng dụng chuyển gene vào thực vật để cải thiện giống cây trồng xoay quanh những mục tiêu như sau:

- Kháng sâu hại, bệnh hại, cỏ dại (các tác nhân sinh học);

- Kháng stress (các yếu tố môi trường);

- Cải thiện năng suất và chất lượng sản phẩm;

- Nâng cao giá trị dinh dưỡng như bổ sung các loại vitamin, acid amin, acid béo;

- Cải thiện thời hạn sử dụng lương thực.

11.2.1. Ứng dụng cải thiện khả năng chống chịu các yếu tố sinh học

11.2.1.1. Các giống cây trồng Bt

Bt (Bacillus thuringiensis) là một loài vi khuẩn có khả năng sản sinh các tinh thể giàu protein (Cry protein) trong giai đoạn bào tử. Những tinh thể này có đặc tính diệt côn trùng và đặc hiệu đối với các loài thuộc Bộ Lepidopteran (Bộ Cánh vẩy). Việc sử dụng *B. thugringiensis* như một loại thuốc trừ sâu vi sinh sẽ có một số lợi thế so với thuốc trừ sâu hoá học, đó là tính đặc hiệu của mỗi loại tinh thể protein đối với một loài côn trùng nhất định, đồng nghĩa với việc chúng sẽ vô hại đối với các loài khác, với môi trường và với người tiêu dùng. Các gene mã hoá cho các tinh thể protein này được thiết kế cùng với promoter cơ định CaMV35S và chuyển vào cây trồng, từ đó các cây này sẽ mang các gene biểu hiện những tinh thể có khả năng trừ sâu hại. Thực tế cho thấy các loài ấu trùng bị tiêu diệt trong vòng 48 tiếng kể từ khi tấn công (ăn) các cây chuyển gene Cry protein, từ đó giảm thiểu sự hư hại của lá cây.

Cùng với việc rất nhiều các giống cây Bt được nghiên cứu, phát triển, thương mại hoá và đưa vào sản xuất, nguy cơ hình thành các loài sâu bệnh đối kháng cũng được đặt ra. Để giải quyết vấn đề này, các giống cây Bt được canh tác theo hệ thống vùng ẩn nấp (refuge system). Cụ thể, song song với việc canh tác các giống cây biến đổi gen, một tỉ lệ (được khuyến cáo bởi nhà sản xuất) các cây không biến đổi gene cũng được trồng cùng lúc, tạo nên một vùng ẩn nấp cho các cá thể côn trùng đích không bị tiêu diệt bởi các Cry protein mà sống sót và sinh trưởng cùng các cá thể côn trùng mang đột biến đối kháng.

11.2.1.2. Cây trồng với các gene mã hoá protein vỏ của virus

Nguyên tắc chung của ứng dụng này là cơ chế đề kháng có nguồn gốc từ mầm bệnh. Gene mã hoá protein vỏ virus khảm thuốc lá (tobacco mosaic virus, TMV) được chuyển vào cây thuốc lá bằng Ti plasmid của *Agrobacterium*. Những cây thuốc lá này biểu hiện protein vỏ virus và có khả năng kháng lại sự tấn công của virion TMV. Ngoài ra, một số giống khoai tây cũng được áp dụng cơ chế này để phát triển giống kháng virus

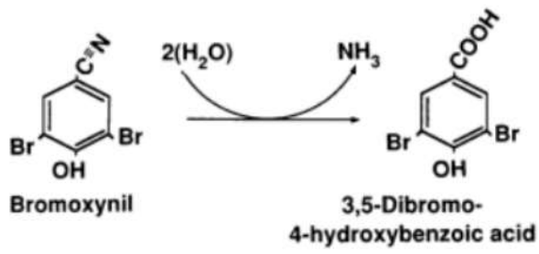
khoai tây Y (potato virus, Y PVY), tương tự với đu đủ Rainbow, Sunup kháng virus đốm vòng đu đủ (papaya ringspot virus, PRSV).

11.2.1.3. Cây trồng kháng thuốc diệt cỏ

Nguyên tắc phổ biến nhất để phát triển một giống cây trồng chuyển gene kháng thuốc diệt cỏ là thay đổi cấu trúc hoá học của hợp chất diệt cỏ hoặc thay đổi mục tiêu tấn công của loại thuốc đó ở cây trồng.

- Thuốc diệt cỏ loại bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile):

Đây là một chất ức chế quang hợp thực vật thông qua ức chế hoạt động của quang hệ II. Gene *bxn* từ vi khuẩn đất *Klebsiella ozaenae*, mã hoá cho một enzyme nitrilase đặc hiệu với chức năng chuyển hoá bromoxynil thành 3,5-dibromo-4-hydroxybenzoic acid, được thiết kế cùng promoter từ gene mã hoá cho tiểu phần nhỏ của enzyme ribulose bisphosphate (RuBP) để gene chỉ biểu hiện ở những mô có hoạt động quang hợp, sau đó chuyển vào tế bào thực vật và phát triển thành cây chuyển gen. Một số loài cây đã được nghiên cứu mang gene này là thuốc lá, cây bông.

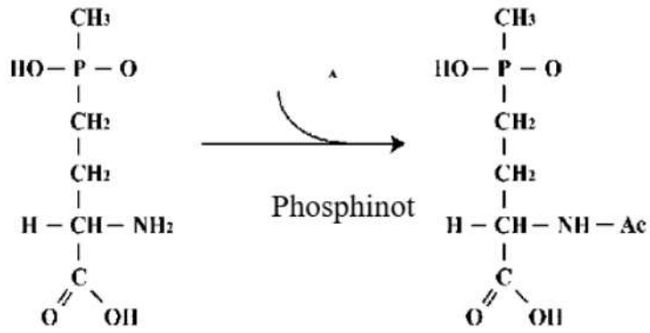


Hình 10.1. Phản ứng chuyển hóa thuốc trừ sâu dạng bromoxynil dưới xúc tác của nitrilase

- Thuốc diệt cỏ loại glufosinate:

Đây là loại thuốc diệt có chứa thành phần hoạt chất phosphinothricin, gây chết cây bằng cách cản trở hoạt động của các enzyme trong chu trình chuyển hoá N giải độc amonia do các hoạt động chuyển hoá ở cây. Các giống cây trồng chuyển gene được thêm gene *bar* (từ vi khuẩn *Streptomyces hygroscopicus*) vào genome có khả năng biểu hiện enzyme phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) nhằm vô hiệu hoá phosphinothricin. Đậu nành là loài đầu tiên có giống chuyển gene kháng glufosinate

được phát triển vào năm 1995, sau đó là các giống ngô, cây bông, cải dầu được nghiên cứu và thương mại hoá.



Hình 11.2. Phản ứng chuyển hóa thuốc trừ sâu dạng phosphinothricin dưới xúc tác của phosphinothricin N-acetyltransferase

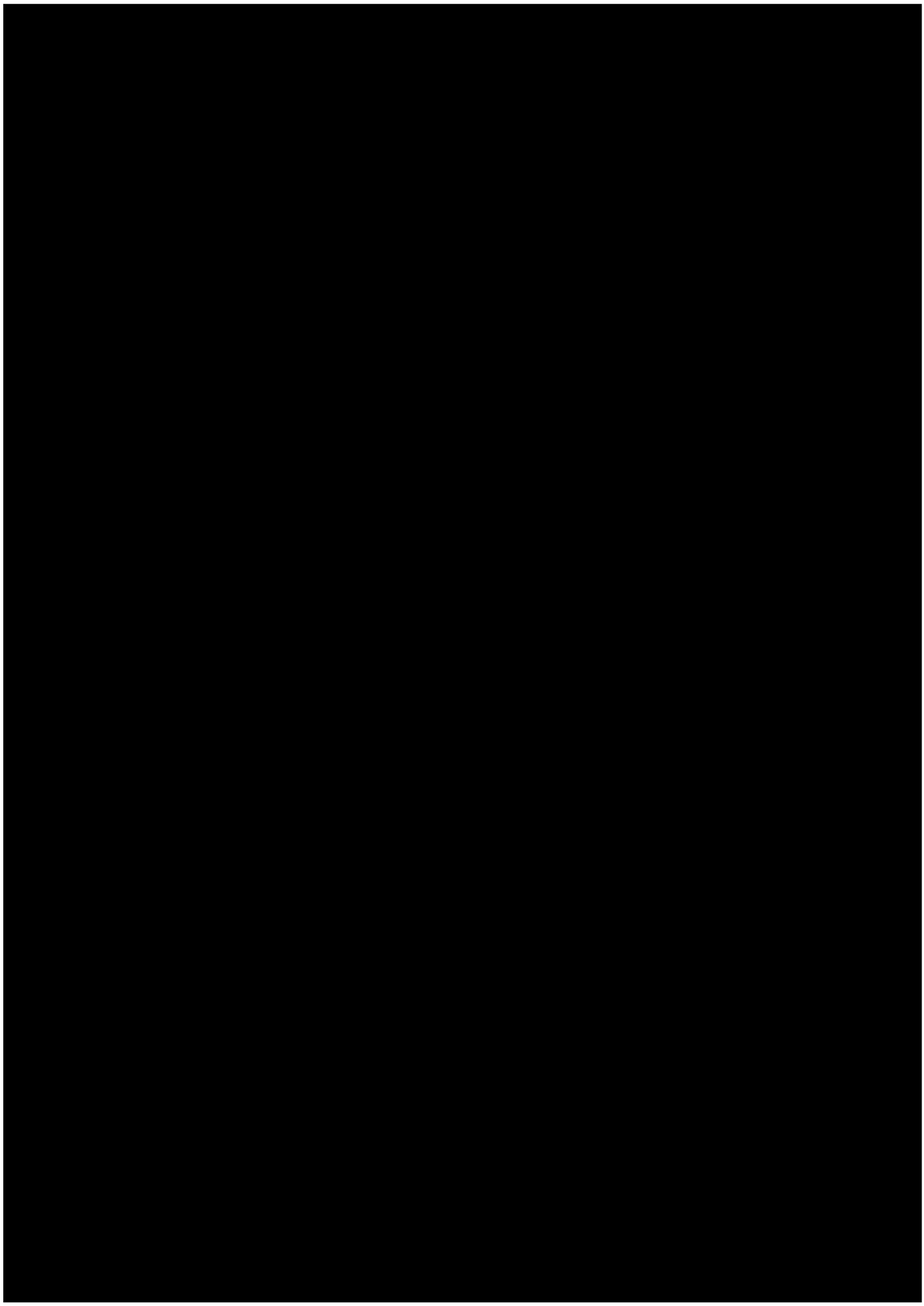
- Thuốc diệt cỏ loại glyphosate:

Loại này gây ức chế hoạt động của 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), enzyme có vai trò trong quá trình sinh tổng hợp amino acid thơm, vitamin và nhiều chất chuyển hoá khác (con đường shikimate).

Bảng 11.2. Một số ví dụ cây trồng chuyển gene kháng thuốc diệt cỏ

Tên gene và nguồn gốc	Sản phẩm mã hoá	Nguyên tắc hoạt động	Ví dụ cây chuyển gen
Gene *dmo* (*Pseudomonas maltophilia*)	dicamba monooxygenase	Chuyển hoá thuốc diệt cỏ dicamba	Đậu nành, bông, ngô, cải dầu
Các gene *add* (*Delftia acidovorans, Sphingobium herbicidovorans*)	aryloxyalkanoate di-oxygenase	Phá huỷ chuỗi bên của thuốc diệt cỏ 2,4-D	Đậu nành, bông, ngô
Gene *surB* (*Nicotiana tabacum*)	acetolactate synthase (ALS)	Kháng thuốc diệt cỏ loại sulfonylurea và các chất ức chế ALS	Cẩm chướng

Có hai phương thức để tạo ra giống cây trồng kháng loại chất diệt cỏ này, đó là:



đường thích nghi với stress. Cần lưu ý đến việc ảnh hưởng đến các quá trình chuyển hoá khác khi tác động gây thay đổi một bước trong một quá trình chuyển hoá cụ thể.

- Các chất bảo vệ thẩm thấu nguồn gốc từ amino acid:

Proline

Cây chuyển gene biểu hiện tăng cường enzyme sinh tổng hợp proline cho thấy khả năng chịu hạn tốt hơn, trong khi đó nếu tăng mức độ phân giải proline sẽ tăng độ nhạy của cây đối với stress thiếu nước. Đã có giống gạo và lúa mì chuyển gene biểu hiện tích trữ proline, từ đó lần lượt có khả năng chịu hạn và chịu mặn tốt hơn.

Glycine betaine

Tăng cường biểu hiện các gene có vai trò sinh tổng hợp glycine betaine (từ thực vật hoặc từ vi khuẩn) ở các loài sản xuất glycine betaine trong tự nhiên (lúa mì, cà chua, khoai tây) này không đồng nghĩa với tăng lượng glycine betaine tích trữ. Điều này được lý giải bởi việc thiếu cơ chất choline trong quá trình chuyển hoá betaine, và phương án này phụ thuộc vào bào quan tích trữ betaine (ví dụ: ở cà chua, biến đổi gene để tích trữ betaine ở lục lạp mang lại khả năng chịu hạn tốt hơn so với tích trữ betaine ở tế bào chất).

- Các chất bảo vệ thẩm thấu dạng đường:

Fructan

Là những oligo- hoặc poly-fructose tích trữ trong không bào của các loài thực vật sống ở khí hậu nhiệt đới. Đã có nghiên cứu về việc biểu hiện gene sinh tổng hợp fructan ở củ cải đường, thuốc lá giúp cải thiện khả năng chịu hạn của cây, tuy nhiên phương án này chưa được ghi nhận đạt hiệu quả trên các giống cây khác.

Polyol

Con đường sinh tổng hợp các polyol là những con đường tương đối đơn giản, do đó dễ dàng hơn cho việc chuyển các gene liên quan để tăng khả năng kháng stress ở cây. Tăng cường tổng hợp các polyol như mannitol, D-ononitol, inositol hay sorbitol thường tăng khả năng kháng stress của cây, điều này được cho là nhờ khả năng điều chỉnh áp suất thẩm thấu của chúng. Tuy nhiên, lượng polyol không luôn luôn tỉ lệ thuận với khả năng kháng stress, đồng thời một số polyol được ghi nhận là gây ra tác dụng không

mong muốn như làm thối cây, ảnh hưởng tới phát triển của cây. Do đó, một yêu cầu rất cần thiết là tìm hiểu kỹ về các dòng chuyển hoá ở thực vật trước khi ứng dụng phương án này lên cây trồng.

Trehalose

Hoạt động như một nguồn carbohydrate dự trữ và là hợp chất bảo vệ khỏi stress, tuy nhiên trehalose không thể được tích trữ ở thực vật. Khi chuyển và biểu hiện các gene mã hoá các enzyme xúc tác cho quá trình sinh tổng hợp trehalose (trehalose phosphate synthase và trehalose-6-phosphate phosphatase), cho kết quả cây trồng có khả năng kháng stress. Tương tự như trường hợp của polyol, hàm lượng trehalose tích trữ không đồng nghĩa với khả năng kháng stress ở cây, tuy nhiên hướng tiếp cận này có thể không mang lại những tác dụng phụ như polyol nếu sử dụng một promoter thích hợp và chuyển gene vào lục lạp.

11.2.3.2. Sử dụng các gene đóng vai trò trong việc điều hoà và truyền tín hiệu dưới điều kiện stress

Các gene được xác định có vai trò trong quá trình điều hoà và truyền tín hiệu trong điều kiện stress chủ yếu mã hoá cho các yếu tố phiên mã và các protein kinase. Vì hoạt động của các gene này được kích hoạt bởi stress, việc biểu hiện các gene này có thể kích hoạt các gene kháng stress khác. Các yếu tố phiên mã có thể gắn đặc hiệu vào một số vùng trên promoter của gene chúng điều hoà, còn các protein kinase có khả năng phosphoryl hoá các cơ chất protein. Một điểm trừ của hướng tiếp cận này là khả năng xuất hiện những hiệu ứng không mong muốn.

- Gene *HARDY (HRD)* mã hoá cho yếu tố phiên mã AP2/ERF, thường tăng cường sự phát triển của rễ và lá, được xác định là một cơ chế chịu hạn của cây và có liên quan tới hiệu quả sử dụng nước.

- Gene mã hoá cho các yếu tố phiên mã DREB1, DREB2 có vai trò trong con đường chịu hạn không phụ thuộc vào ABA, từ đó kích hoạt biểu hiện của các gene kháng stress thông qua yếu tố điều hoà dạng *cis* DRE/CRT. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận biểu hiện chịu hạn, chịu mặn và chịu đông đá ở cây khi ứng dụng phương án này (cải dầu, cà chua, lúa mì, gạo), tuy nhiên cũng có một số trường hợp xuất hiện tác dụng không mong

muốn, ví dụ như *Arabidopsis* mang gene mã hoá cho AtDREB1A biểu hiện kiểu hình cây lùn đồng thời với khả năng chịu hạn.

- Tăng cường biểu hiện gene *OsCDPK7* (thuộc họ protein kinase phụ thuộc vào Ca^{2+} CDPK) cho kết quả là khả năng chịu lạnh, chịu mặn và chịu hạn ở cây lúa. Nguyên nhân nằm ở sự cảm ứng biểu hiện các gene *LEA* (late embryogenesis abundant) có vai trò trong gia tăng khả năng kháng stress ở lúa.

- Các đối tượng khác như các kênh vận chuyển nước (aquaporin) và vận chuyển ion cũng là mục tiêu của phương pháp chuyển gene nhằm tạo ra cây trồng chịu hạn

Như đã nói trên, các cơ chế chịu hạn của cây đều rất phức tạp và liên quan tới hoạt động đồng thời của nhiều gene, do đó việc chuyển một gene đơn lẻ vào cây và quan sát biểu hiện cũng như những thay đổi sinh hoá của cây không phù hợp để ứng dụng nghiên cứu cây chuyển gene chịu hạn. Chưa kể đến việc các tính trạng chịu hạn là tính trạng số lượng, khó có thể duy trì qua các thế hệ và chịu nhiều ảnh hưởng của các yếu tố môi trường.

11.2.4. Ứng dụng cải thiện chất lượng sản phẩm

11.2.4.1. Ứng dụng cải thiện giá trị dinh dưỡng của nông sản

Có nhiều cách để cải thiện giá trị dinh dưỡng của nông sản thông qua ứng dụng chuyển gene thực vật, có thể là thêm vào một chất dinh dưỡng mới, gia tăng hàm lượng dưỡng chất được tổng hợp bởi cây trồng hoặc loại trừ các chất phản dinh dưỡng/chất độc của cây.

- Lúa gạo là loại lương thực chính của nhiều nơi trên thế giới, tuy nhiên lại không chứa β-carotene (tiền vitamin A). Do đó, việc tiêu thụ khối lượng lớn gạo mà không bổ sung vitamin A từ các loại thực phẩm khác đã gây ra hậu quả thiếu vitamin A, chủ yếu ở các nước châu Phi và Nam Á. Với muc tiêu khắc phục tình trạng này, các nhà khoa học đã nghiên cứu và phát triển giống gạo vàng (Golden Rice) chứa các gene *psy1*, *crt1* mã hoá cho các enzyme phytoen synthase, phytoen desaturase trong quá trình tổng hợp carotenoid, từ đó có khả năng tổng hợp β-carotene ở phôi nhũ. Giống gạo này đã được chấp nhận sử dụng ở Mỹ, Canada, Úc, New Zealand và Philippines.

- Với hàm lượng acid oxalic cao (một loại chất phản dinh dưỡng), việc tiêu thụ quá nhiều đậu nành có thể gây sỏi thận. Oxalate decarboxylase (OXDC) là enzyme xúc tác cho phản ứng phân huỷ acid oxalic thành acid formic và carbon dioxide. Ứng dụng chuyển gene để biểu hiện enzyme này cho kết quả hàm lượng acid oxalic ở đậu nành giảm tới 73% cùng với gia tăng một số chất vi lượng như canxi, sắt và kẽm ở hạt.

11.2.4.2. Tăng thời hạn bảo quản thực phẩm

Việc tăng thời hạn bảo quản thực phẩm cần đi đôi với việc đảm bảo các tính trạng của chúng, như màu sắc, hương vị, hàm lượng dinh dưỡng. Để trì hoãn thời gian chín của trái cây, các phương pháp như antisene RNA hay RNA can thiệp được ứng dụng.

- Giảm lượng ethylene sản sinh từ trái cây: đây là môt phương án thường được sử dụng để khiến các loại trái cây chín chậm hơn bằng cách ức chế các gene mã hoá cho các enzyme trong quá trình tổng hợp ethylene như 1-aminocyclopropane-1-carboxylicacid synthase (ACS) hoặc ACC oxidase (ACO). Tuy nhiên đây không phải là phương án phù hợp đối với các loại trái cây có giai đoạn chín không phụ thuộc vào khí hậu (chỉ chín trên cây).

- Ức chế biểu hiện của gene mã hoá enzyme α-mannosidase (α-man) và β-D-N-acetylhexosaminidase (β-hex) xúc tác quá trình phân giải N-glycan, thành phần cấu tạo của thành tế bào, đã tăng thời hạn bảo quản cà chua lên khoảng 2-2,5 lần. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy ức chế hai gene trên cũng trì hoãn thời gian hư hỏng của các loại trái thuộc chi Ớt. Như vậy, điều chỉnh hoạt động của các gene liên quan đến quá trình chuyển hoá N-glycan là phương án tiềm năng có thể ứng dụng cho các loại trái cây có giai đoạn chín phụ thuộc hay không phụ thuộc vào khí hậu.

- Enzyme polygalacturonase (PG) là enzyme tham gia vào quá trình phân giải thành tế bào hemicellulose và khiến trái cây mềm đi trong quá trình bảo quản. Khi ức chế gene *PG* (bằng phương pháp RNA can thiệp), nhiều loại trái cây được ghi nhận là ít bị mềm đi mà không thay đổi các tính chất khác như màu sắc, khối lượng và hàm lượng dinh dưỡng.

11.3. Vấn đề an toàn sinh học của cây trồng chuyển gene

11.3.1. Những câu hỏi đặt ra về an toàn sinh học của cây trồng chuyển gene

An toàn sinh học được hiểu là những hành động phòng ngừa, hạn chế và loại bỏ những nguy cơ của việc nghiên cứu, sản xuất, sử dụng, giáo dục, dịch vụ hay phát triển công nghệ liên quan tới sinh vật biến đổi gene nói chung. Mục đích của an toàn sinh học là bảo vệ cho sức khỏe của cộng đồng, của các loài động vật và bảo vệ môi trường. Song song với lịch sử phát triển của các phương pháp chuyển gene, biến đổi gene là những thay đổi trong nguyên tắc của an toàn sinh học.

An toàn sinh học thực phẩm từ thực vật biến đổi gene được đưa ra nhằm đánh giá những tác động nguy hiểm của chúng lên sức khỏe cộng đồng thông qua đánh giá các hóa chất độc hại, dư lượng thuốc trừ sâu, các chất ô nhiễm hay phụ gia trọng thực phẩm. Quá trình đánh giá này được thực hiện bởi các tổ chức như: Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization, WHO), Hội đồng quốc tế về Khoa học (the International Council for Science), Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hợp Quốc (the Food and Agriculture Organization, FAO) và các Viện Hàn lâm Khoa học của các quốc gia như Mỹ, Ấn Độ, Ý, Brazil,…

An toàn sinh học môi trường liên quan tới những ảnh hưởng, tác động của thực vật biến đổi gene lên môi trường xung quanh. Tiêu biểu có những vấn đề đặt ra về tác động của cây trồng chứa gene Bt lên các sinh vật phi mục tiêu như ong, bọ rùa hay tiềm ẩn nguy cơ chuyển gene từ các loài sinh vật biến đổi gene thông qua sự phát tán của hạt phấn.

Thực vật biến đổi gene vẫn đã và đang là chủ đề gây tranh cãi dù chúng được nhanh chóng ứng dụng và canh tác bởi người nông dân. Một ví dụ kinh điển của thực vật biến đổi gene là giống ngô Bt biểu hiện Cry protein để chống lại sự tấn công của các loại sâu hại thuộc Bộ Lepidoptera, ví dụ như *Ortrinia nulalis* (European corn borer) hay *Sesamia nonagrioides* (Mediterranean corn borer). Trước khi giống ngô này được đưa vào canh tác và sản xuất, rất nhiều các đánh giá về rủi ro đã được thực hiện nhằm xác định các khía cạnh:

- Ảnh hưởng không mong muốn lên chính cây trồng biến đổi gene;

- Khả năng chuyển các gene ngoại lai từ ngô sang các loài vi sinh vật hay sang các loài thực vật khác;

- Nguy cơ hình thành các loài sâu hại đối kháng;

- Ảnh hưởng lên sức khoẻ của con người và các loài động vật khác khi trực tiếp và không trực tiếp tiêu thụ sản phẩm ngô biến đổi gene;

Ảnh hưởng lên hệ sinh thái, môi trường vô sinh và các chu trình sinh địa hoá.

Đây cũng là những câu hỏi thường xuyên được đặt ra liên quan đến vấn đề an toàn sinh học của cây trồng biến đổi gene.

11.3.2. Các quy định về cây trồng chuyển gene

11.3.2.1. Định nghĩa về cây trồng chuyển gene theo hai cách tiếp cận hiện nay

Ở Châu Âu, quy định về GMO theo hệ thống dựa trên quá trình, tức kỹ thuật tạo giống được sử dụng sẽ được cân nhắc và từ đó đặt câu hỏi về vấn đề an toàn sinh học. Một sinh vật biến đổi gene theo đó được đặc trưng bởi kỹ thuật tạo giống và được định nghĩa là sinh vật mà vật chất di truyền được thay đổi theo một cách không xảy ra trong tự nhiên thông qua giao phối và/hoặc tái tổ hợp tự nhiên ("*the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination*", EC2001), trong đó không kể đến thụ tinh trong ống nghiệm (IVF), các hiện tượng biến nạp tự nhiên (biến nạp, tải nạp, giao nạp) và đa bội hoá.

Trong khi đó, Mĩ và Canada lại có cách tiếp cận dựa trên sản phẩm cho các quy định về GMO. Các quy định này chú trọng vào đánh giá những rủi ro tiềm ẩn của sản phẩm có nguồn gốc từ sinh vật biến đổi gene chứ không phải cách thức tạo ra sản phẩm đó (ở đây là kỹ thuật tạo giống), bởi công nghệ gene về bản chất không được coi là có rủi ro. Như vậy, các tính trạng mới được thêm vào cây trồng và các sản phẩm từ chúng mới là mục tiêu phân tích, đánh giá, chứ không phải các kỹ thuật được áp dụng để tạo ra giống cây đó.

11.3.2.2. Các nguyên tắc cơ bản trong phân tích rủi ro của thực vật biến đổi gene

Quá trình phân tích rủi ro các thực vật biến đổi gene dựa trên nền tảng rằng chúng không nguy hiểm gì hơn so với các loài thực vật thông thường, nghĩa là: một nguy cơ từ thực vật biến đổi gene không bắt nguồn từ lý do biến đổi gene, mà liên quan tới kết quả của sự thay đổi đó. Về cơ bản, quá trình này bao gồm 3 thành phần: đánh giá rủi ro, quản lý rủi ro và giao tiếp rủi ro.

a. Đánh giá rủi ro:

Điều này nghĩa là các tác động bất lợi, các nguy cơ tiềm ẩn của từng trường hợp cây trồng biến đổi gene sẽ được đưa ra căn cứ trên các cơ sở khoa học. Để đánh giá rủi ro cần phải thực hiện các nội dung:

- *Xác định nguy cơ:* xác định các yếu tố sinh học, hóa học hay vật lý có nguy cơ ảnh hưởng xấu tới sức khỏe cộng đồng hoặc tới môi trường.

- *Xác định đặc tính của nguy cơ:* tức đánh giá nguy cơ đó về mặt số lượng, chất lượng và tính nghiêm trọng của những ảnh hưởng của chúng lên sức khỏe, môi trường

- *Thử nghiệm phơi nhiễm:* đánh giá định tính, định lượng khi phơi nhiễm với nguy cơ đó

- *Xác định đặc tính rủi ro:* kết hợp những thành phần trên và đưa ra kết luận về đặc tính của những rủi ro tiềm tàng

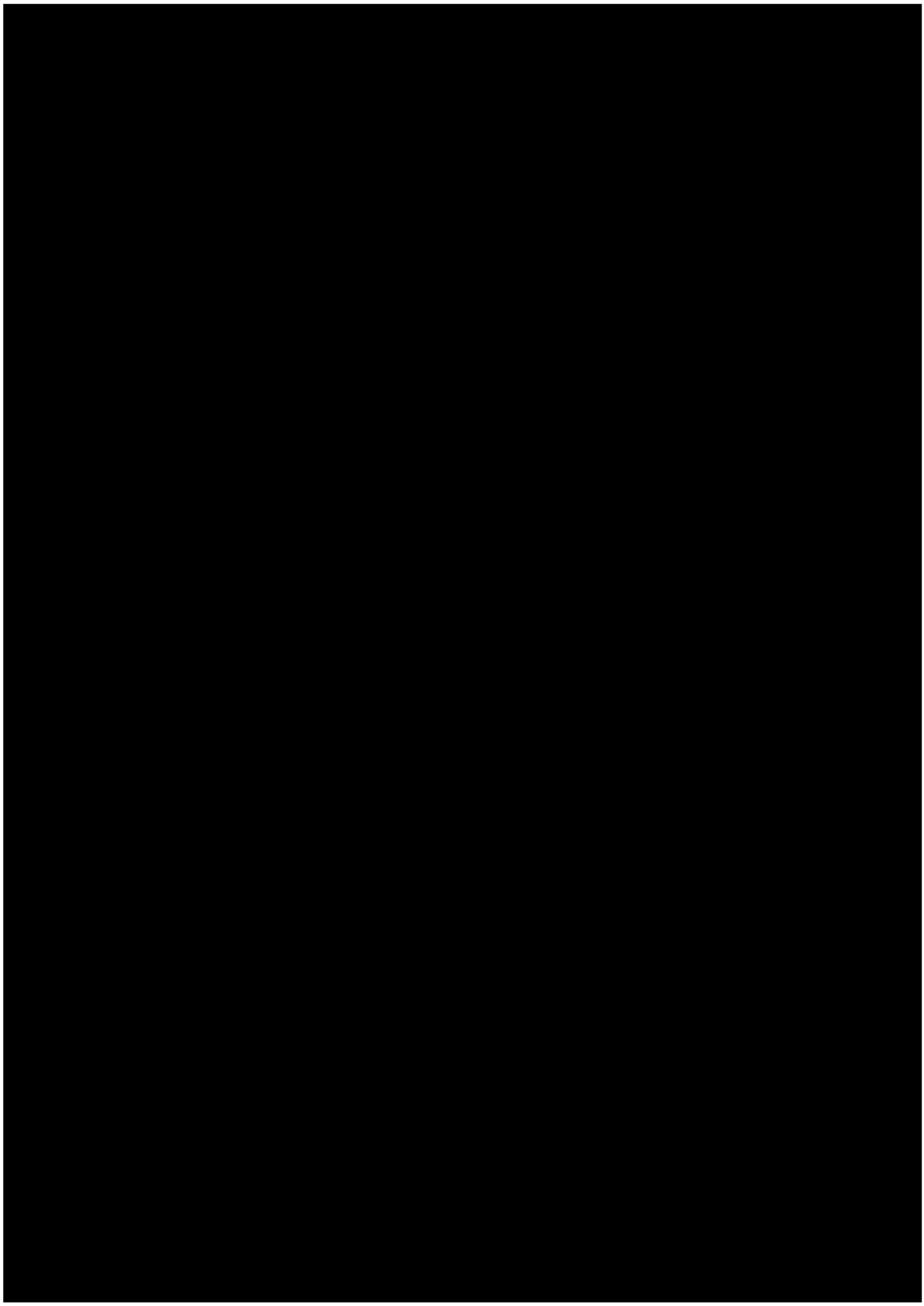
b. Quản lý rủi ro:

Điều này có nghĩa là việc đưa ra và/hoặc thay thế các chính sách, phương án phòng ngừa và kiểm soát thích hợp để giảm thiểu các rủi ro trên cơ sở đánh giá trên. Việc quyết định rằng các rủi ro tiềm ẩn có thể được chấp thuận hay không lại không phải là một phần của đánh giá rủi ro, bởi điều này chịu ảnh hưởng không chỉ từ khía cạnh khoa học (các nhà khoa học) mà còn từ khía cạnh chính trị, xã hội, văn hoá và kinh tế. Trên lý thuyết, đánh giá rủi ro và quản lý rủi ro được tách bạch (tạm thời) về chức năng nhằm mục đích hạn chế những tranh cãi, xung đột về lợi ích và bảo vệ liêm chính khoa học trong đánh giá rủi ro.

c. Giao tiếp rủi ro:

Khái niệm dùng để chỉ những tương tác, trao đổi thông tin từ phía người đánh giá rủi ro, các nhà quản lý rủi ro và các bên liên quan khác, bao gồm cả quá trình giải thích, làm rõ những đánh giá và từ đó các quyết định của quản lý rủi ro được đưa ra.

Những khái niệm trên được áp dụng ở các nước thuộc Liên minh Châu Âu và có sự khác biệt đáng kể trong chính sách quản lý thực vật biến đổi gene ở các nước khác nhau. Dù vậy, công tác đánh giá rủi ro của thực vật biến đổi gene hầu hết đều được thực hiện theo các nguyên tắc:



ra, các thí nghiệm trên quy mô lớn (cấp độ cao hơn) có thể được yêu cầu thực hiện để đảm bảo hiểu biết về những tác hại của thực vật biến đổi gene lên môi trường và hệ sinh thái.

11.3.3. Vấn đề an toàn sinh học của các cây trồng mang tính trạng mới tạo ra bởi hệ thống chỉnh sửa hệ gene

11.3.3.1. Nghiên cứu về việc phơi nhiễm với protein Cas9

Một số công bố khoa học đã nghiên cứu về việc con người phơi nhiễm với Cas protein. Theo đó, Cas9 phân lập từ *S. pyogenes*, thường dùng trong các thí nghiệm chỉnh sửa genome có độ tương đồng từ 25-58% với Cas9 phân lập từ *Streptococcus thermophillus* (vi khuẩn thường được sử dụng như một loại probiotic và có mặt trong các sản phẩm từ sữa như phô mai hoặc yogurt) và 35% tương đồng với *Lactobacillus plantarum* (từ các sản phẩm từ sữa, thịt và các sản phẩm lên men). Đồng thời cũng có sự tương tự giữa Cas9 của *S. pyogenes* và các vi khuẩn gây bệnh cho người như *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia* hay *S. canis* (El-mounadi và cộng sự, 2020). Như vậy, con người đã tiếp xúc với Cas9 protein lâu nay (thông qua các thức ăn và môi trường), trước cả sự phát triển của các phương pháp chỉnh sửa hệ gene. Do đó, vấn đề an toàn sinh học của các cây trồng tạo ra nhờ phương pháp CRISPR - Cas9 cần được nghiên cứu đầy đủ hơn.

11.3.3.2. Vấn đề an toàn sinh học của thực vật chỉnh sửa gene

Một khái niệm mới được đưa ra để gọi tên các cây trồng tạo ra từ các phương pháp chỉnh sửa genome, đó là thực vật chỉnh sửa gene (genetically edited, GE). Khác với các cây biến đổi gene (genetically modified, GM), một số quy trình chỉnh sửa genome đã được nghiên cứu để chuyển các protein ZNF, TALEN hay phức hợp RNP Cas9/guide RNA vào tế bào thực vật mà không thông qua biểu hiện gene của gene ngoại lai (cần lưu ý rằng gRNA không phải là RNA tái tổ hợp). Như vậy, các cây con được hình thành không mang gene ngoại lai nhưng vẫn có tính trạng mong muốn. Ngoài ra, các cây chuyển gene có thể mang gene mã hóa cho gRNA và Cas9, nhưng những gene này có thể được loại bỏ ở các thế hệ cây con thông qua phân li độc lập và tổ hợp tự do mà không mất đi tính trạng mới.

Dù vậy, việc tạo ra giống cây trồng mới bằng các phương pháp chỉnh sửa genome, đặc biệt là bằng CRISPR/Cas9 vẫn vướng nhiều tranh cãi về vấn đề đảm bảo an toàn sinh học. Nếu áp dụng định nghĩa của các nước Mỹ, Canada, thực vật GE không chứa gene ngoại lai thì không được xem là thực vật biến đổi gene. Tuy nhiên, quy định của EU (dựa theo phương pháp tạo nên giống cây mới) vẫn xem thực vật GE là thực vật biến đổi gene. Năm 2018, Tòa án Công lý châu Âu (European Court of Justice) đã phân loại sinh vật chỉnh sửa gene là sinh vật biến đổi gene, do đó thực vật chỉnh sửa gene vẫn phải tuân theo các quy định, nguyên tắc chung cho sinh vật biến đổi gene.

11.4. Các quy định và tình hình ứng dụng cây trồng biến đổi gene tại Việt Nam

11.4.1. Các quy định liên quan đến cây trồng biến đổi gene

Nghị định 69/2010/NĐ-CP ngày 21/10/2010 về "An toàn sinh học đối với sinh vật biến đổi gen, mẫu vật di truyền và sản phẩm của sinh vật biến đổi gen" nêu rõ các khái niệm cơ bản trong vấn đề an toàn sinh học đối với sinh vật biến đổi gene nói chung và thực vật biến đổi gene nói riêng, bao gồm:

1. *Giấy chứng nhận an toàn sinh họ*c là văn bản do cơ quan nhà nước có thẩm quyền cấp để chứng nhận sinh vật biến đổi gen an toàn đối với môi trường và đa dạng sinh học và được phép phóng thích vào môi trường trong các điều kiện cụ thể.

2. *Sản phẩm của sinh vật biến đổi gen* là sản phẩm có chứa toàn bộ hoặc một phần thành phần có nguồn gốc từ sinh vật biến đổi gen, bao gồm cả mẫu vật di truyền của sinh vật biến đổi gen không có khả năng tự tạo cá thể mới trong điều kiện tự nhiên.

3. *Sinh vật cho* là sinh vật cung cấp gen cần chuyển để tạo ra sinh vật biến đổi gen.

4. *Sinh vật nhận* là sinh vật nhận gen chuyển để tạo ra sinh vật biến đổi gen.

5. *An toàn sinh học* là các biện pháp quản lý để bảo đảm an toàn đối với môi trường, đa dạng sinh học, sức khỏe con người và vật nuôi.

Đồng thời, Nghị định 69/2010/NĐ-CP ngày 21/10/2010 cũng quy định cụ thể các nguyên tắc đánh giá rủi ro của sinh vật biến đổi gene đối với môi trường, đa dạng sinh hoc và sức khỏe con người, vật nuôi là đảm bảo tính khoa học, minh bạch; theo từng trường hợp cụ thể và dựa trên cơ sở so sánh khác biệt giữa sinh vật nhận và sinh vật biến đổi gene. Việc đánh giá rủi ro này bao gồm đánh giá nguy cơ, rủi ro tiềm ẩn, khả năng

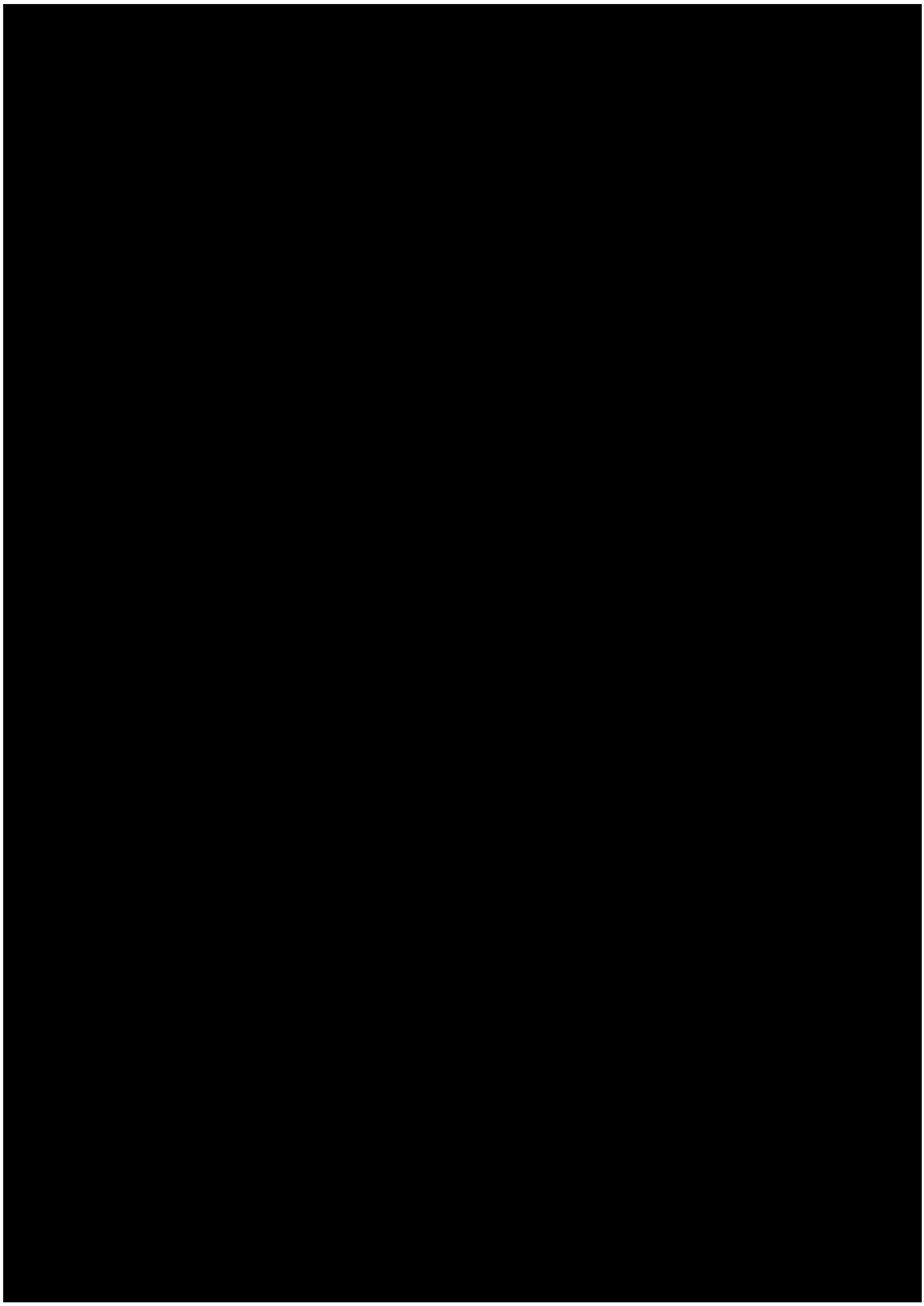
xảy ra những nguy cơ, rủi ro đó và đề xuất phương án phòng ngừa, xử lý, khắc phục. Kết quả đánh giá được trình bày thông qua các báo cáo tới Bộ TN&MT, được thực hiện bởi các tổ chức, cá nhân hoạt động nghiên cứu. Ngoài ra, Bộ KH&CN có trách nhiệm quy định, hướng dẫn, công nhận và kiểm tra định kỳ các phòng thí nghiệm nghiên cứu sinh vật biến đổi gene; Bộ NN&PTNT chịu trách nhiệm quy định, hướng dẫn và công nhận các yêu cầu, nội dung và cơ sở cho hoạt động khảo nghiệm sinh vật biến đổi gene.

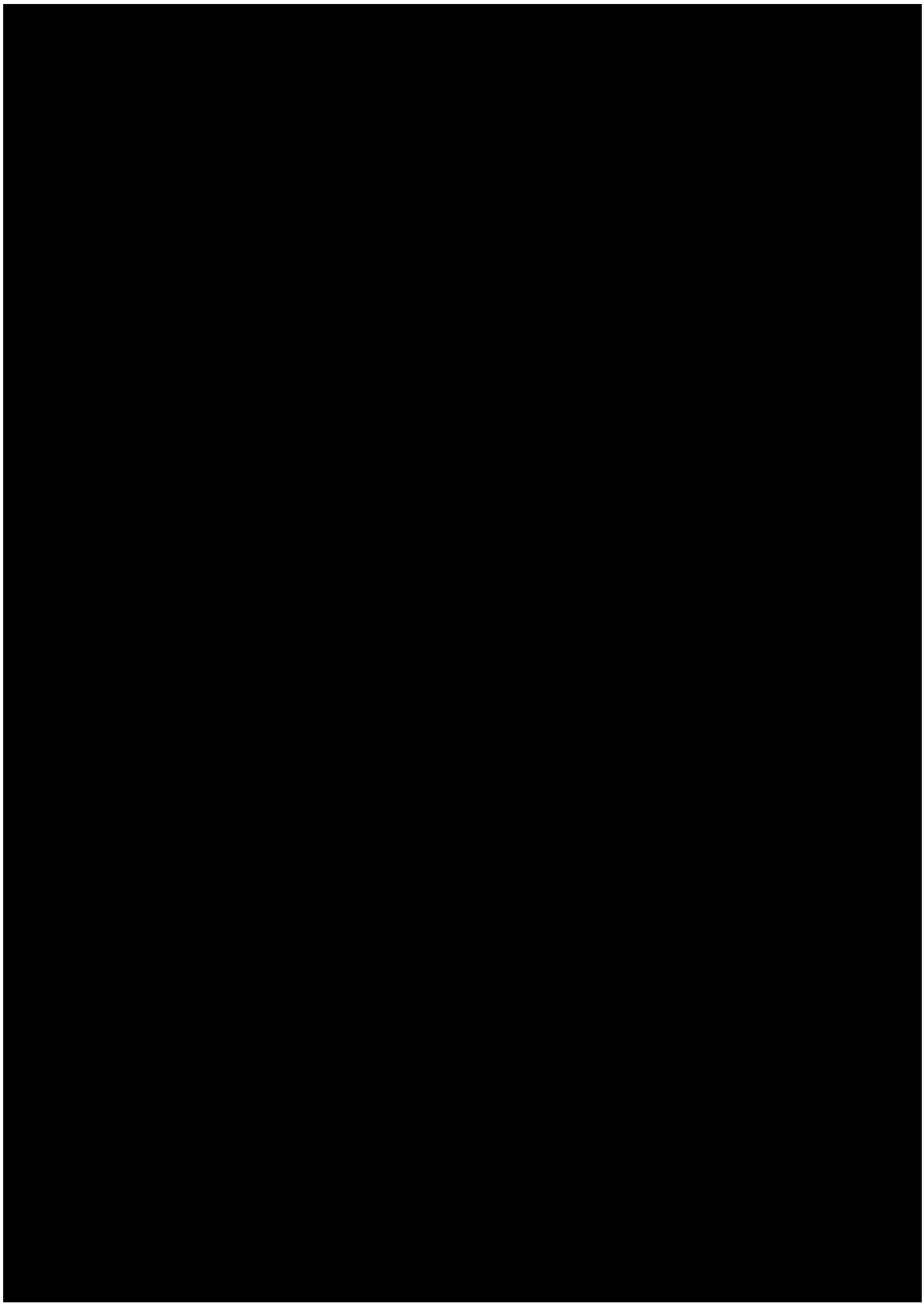
Cho tới thời điểm hiện nay, Nghị định 69/2010/NĐ-CP đã được sửa đổi, bổ sung nhằm quản lý chặt chẽ hơn việc sử dụng sinh vật biến đối gene, đồng thời phù hợp với các quy định quản lý, thông lệ quốc tế, trong đó có Nghị định thư Cartagena về an toàn sinh học (tiếng anh: Cartagena Protocol on Biosafety) mà Việt Nam là quốc gia thành viên, hay quy định của các tổ chức quốc tế như có liên quan như Chương trình Môi trường Liên hợp quốc (UNEP), Tổ chức lương thực và nông nghiệp Liên hợp quốc (FAO).

11.4.2. Tình hình ứng dụng cây trồng chuyển gene tại Việt Nam

Bảng 11.3. Các sự kiện ngô biến đổi gene ở Việt Nam tính đến cuối năm 2014 (Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ TP. HCM, 2015)

TT	Công ty	Sự kiện biến đổi gene		Ghi chú
		Tên giống ngô	Gene ngoại lai và tính trạng mới	
	Công ty TNHH Dekalb Việt Nam	MON 89034	*cry 1A.105* và *cry 2Ab2*; kháng sâu bộ cánh vảy	*
	Công ty TNHH Dekalb Việt Nam	NK 603	*cp4 epsps*; kháng thuốc trừ cỏ Roundup	*
	Công ty TNHH Syngenta Việt Nam	Bt 11	*Cry1A(b)*; kháng sâu đục thân	*
	Công ty TNHH Syngenta Việt Nam	GA21	*mEPSPS*; chống chịu thuốc trừ cỏ glyphosate	*
	Công ty TNHH Syngenta Việt Nam	MIR 162	*vip3Aa20;* kháng sâu bộ cánh vảy	**
	Công ty TNHH Pioneer Hi-Bred Việt Nam	TC 1507	*cry1F;* kháng côn trùng cánh vảy	**





TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

Ngô Xuân Bình (2009), "*Nuôi cấy mô và tế bào thực vật - Cơ sở lý luận và ứng dụng*", Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.

Trần Quốc Dung, Trần Thị Lệ, Nguyễn Hoàng Lộc (2010), "*Giáo trình Công nghệ chuyển gen ở động-thực vật*", NXB Đại học Huế.

Trần Thị Lệ, Trương Thị Bích Phượng, Trần Thị Triệu Hà (2008), "*Giáo trình Công nghệ Sinh học thực vật*", Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.

Nguyễn Hoàng Lộc (2011), *"Nuôi cấy mô và tế bào thực vật"*, Nhà xuất bản Đại học Huế

Nguyễn Hoàng Lộc (2013), "*Sản xuất một số hợp chất dược phẩm bằng nuôi cấy tế bào thực vật và cây trồng chuyển gen*", Nhà xuất bản Đại học Huế.

Nguyễn Văn Đồng, Ngô Xuân Bình (2010), "*Giáo trình Công nghệ sinh học thực vật*", Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Lê Văn Hoàng (2008), "*Giáo trình Công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật*", Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng.

Dương Tấn *Nhựt (2011), "Công nghệ sinh học thực vật- Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng*", Nhà xuất bản Nông Nghiệp.

Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến (2012), "Công nghệ sinh học thực vật trong thế ki XXI: triển vọng và thách thức", *Vietnam Journal of Science and Technology*, 50(6), 859-859.

Nghị định số 69/2010/NĐ-CP ngày 21/10/2010 của Chính phủ nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam về "An toàn sinh học đối với sinh vật biến đổi gen, mẫu vật di truyền và sản phẩm của sinh vật biến đổi gen".

TIẾNG ANH

Abdin M. Z., Kiran U., Kamaluddin, Ali A (2017), "*Plant Biotechnology: Principles and applications*", Springer Singapore, Singapore.

Acharya S., Maiti S., Chakraborty D. (2020), "CRISPR-Cas9 for therapy: the challenges and ways to overcome them", *Genomes Engineering via CRISPR-Cas9 system*, 9, 101-110.

Acharya S., Maiti S., Chakraborty D. (2020), "CRISPR-Cas9 for therapy: the challenges and ways to overcome them", *Genomes Engineering via CRISPR-Cas9 system*, 9, 101-110.

Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. (2008), "Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences", *Plant Cell Reports*, 27(4), 617-631.

Aguilera A., Rothstein R. (2007), "*Molecular genetics of recombination*", Springer Berlin.

Ali Z., Ali S., Tashkandi M., Zaidi S. S., Magdy M. M. (2016), "CRISPR/Cas9-mediated immunity to geminiviruses: differential interference and evasion", *Scientific Reports*, 6, 26912.

Allison, L. A. (2007), "*Fundamental Molecular Biology*", Blackwell Publishing, Vancouver.

Anami S., Njuguna E., Coussens G., Aesaert S., Van Lijsebettens M. (2013), "Higher plant transformation: principles and molecular tools, *International Journal of Developmental Biology*, 57(6-7-8), 483-494.

Anami S., Njuguna E., Coussens G., Aesaert S., Van Lijsebettens M. (2013), "Higher plant transformation: principles and molecular tools, *International Journal of Developmental Biology*, 57(6-7-8), 483-494.

Ashmore S.E. (1997), "*Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources*". IBPGR, Rome Benson EE (ed) (1999) Plant conservation biotechnology, Taylor and Francis, London.

Bassett C. L., Farrell Jr. R. E. Hily J., Hunt A. G., Liu Z., Louzada E. S. (2007), "*Regulation of Gene Expression in Plants*", Springer, Kearneysville.

Bayraktar M., Hayta-Smedley S., Unal S., Varol N., Gurel A., (2020). "Micropropagation and prevention of hyperhydricity in olive *(Olea europaea L.)* cultivar 'Gemlik'", *South African Journal of Botany*, 128, 264-273.

Belwal T., Georgiev M. I., Al-Khayri J. M. (2022), "*Nutraceuticals production from plant cell factory*", Springer Nature.

Bhojwani S. S., Dantu P. K. (2013), "*Plant tissue culture: an introductory text*", Springer, India.

Bhojwani S. S., Dantu, P. K. (2013), "*Plant tissue culture: An introductory text (No. 574.0724/B575)*", Springer, India.

Bio-Rad, What is Real-time PCR (qPCR)?, bio-rad.com/en-vn/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU, 2022

Bock R. (2015), "Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology", *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), 211-241.

Brzycki C. M., Young E. M., Roberts S. C. (2021), "*Secondary metabolite production in plant cell culture: a new epigenetic frontier*", Springer Nature.

Chandran H., Meena M., Barupal T., Sharma K. (2020), "Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds", *Biotechnology Reports*, 26, e00450.

Clark D. P., Pazdernik N. J., McGehee M. R. (2019), "*Molecular Biology (Third Edition*", Elsevier.

Clark M. S. (2013), "*Plant molecular biology—a laboratory manual*", Springer Science & Business Media.

Clarke J. L., Daniell H. (2011), "Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives", *Plant Molecular Biology*, 76(3), 211-220.

Coleman J., Evans D., Kearns A. (2003), "*Plant cell culture*", Taylor & Francis.

Dale P. J., Irwin J. A., Scheffler J. A. (1993), "The experimental and commercial release of transgenic crop plants", *Plant Breeding*, 111(1), 1-22.

Dix P. J. (1990), "*Plant cell line selection (procedures and applications)*", VCH Verlagsgesell schaft mbH.

Dullo M. E., Ebert A. W., Dussert S., Gotor E., Astorga C., Vasquez N., Rakotomalala J. J., Rabemiafara A., Eira M., Bellachew B., Omondi C., Engelmann F., Anthony F., Watts J., Qamar Z., Snook L. (2009), "Cost efficiency of cryopreservation as long term conservation method for coffee genetic resources", *Crop Sci*, 49:1–16.

El-mounadi K., Morales-Floriano M. L., Garcia-Ruiz H. (2020), "Principles, applications, and biosafety of plant genome editing using CRISPR-Cas9", *Frontiers in Plant Science*, 11, 56.

Engelmann F. (2011), "*Cryopreservation of embryos: an overview. In: Thorpe TA, Yeung EC (eds) Plant embryo culture methods and protocols: methods in molecular biology*", Vol 710. Springer, New York.

Faisal M., Alatar A. A., (2022). "Establishment of an Efficient In Vitro Propagation Method for a Sustainable Supply of *Plectranthus amboinicus (Lour.)* and Genetic Homogeneity Using Flow Cytometry and SPAR Markers", *Horticulturae*, 8(8), 693.

Fári M. G., Kralovánszky, U. P. (2006). "The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Ereky". *International Journal of Horticultural Science*, 12(1), 9-12.

Gaj T., Sirk S. J., Shui S., Liu J. (2016), "Genome-Editing Technologies: Principles and Applications", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(12), a023754.

Gamborg O. L., Kumar A. S. , Hanning G. E., Nabors M. W. (1989), "Tissue culture and biotechnology applied to stress tolerance in plants", *Proceedings of the international confrence on in vitro selection and propagation of economic plants,* University of Peshawar, Pakistan.

Gleba Y. Y., Tusé D., Giritch A. (2013), "Plant viral vectors for delivery by Agrobacterium", *Plant viral vectors*, 155-192.

Glick B. R. (2018), "*Methods in plant molecular biology and biotechnology*". CRC Press.

Golubov A. (2016), "CRISPR: Bacterial Immune System", *Genome stability*, II(6), 87-98.

Gonzalez-Arnao M. T., Panta A., Roca W. M., Escobar R. E., Engelmann F. (2008), "Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops", *Plant Cell Tiss Org Cult*, 92:1–13.

Grotewold E., Chappell J., Kellogg E. A. (2015), "Plant Genetic Material", *Plant Genes, Genomes and Genetics,* 1-16.

Grover A., Sharma P. C. (2016), "Development and use of molecular markers: past and present", *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 290-302.

Gupta S., Kumar A., Patel R., Kumar V. (2021), "*Genetically modified crop regulations: scope and opportunity using the CRISPR-Cas9 genome editing approach*", Molecular Biology Reports, 48, 4851-4863.

Gupta V., Sengupta M., Prakash J., Tripathy B. C. (2017), "*Basic and Applied aspects of Biotechnology*", Springer, Singapore.

Hartmann H. T., Kester D. E., Davies F. T. (1993), "*Plant propagation: Principles and Practices, 5th Edition*", Pretice-Hall of India Private Limited, New Delhi.

He S. L. (2013), "Northern blot", *Methods in enzymology*, 503, 75-87.

He Y., Zhao Y. (2019), "Technological breakthroughs in generating transgene-free and genetically stable CRISPR-edited plants", *aBIOTECH*, 1, 88-96.

Heldt H.-W., Piechulla B. (2021), "A plant cell has three different genomes*", Plant Biochemistry*, 469-501.

Henry R. J. (2012), "Molecular markers in plants", John Wiley & Sons.

Heslop-Harrison J. P., Schmidt T. (2012), "*Plant nuclear genome composition*". eLS.

Heslop-Harrison J. P., Schwarzacher T. (2011) "Organisation of the plant genome in chromosomes", *The Plant Journal*, 66, 18-33.

Hildebrandt A. C., Jones L. E., Riker A. J., & Wu J. H. (1960), "Growth of somatic tobacco cells in microculture", *American Journal of Botany*, 47(6), 468-475.

Hobbie L., Timpte C., Estelle M. (1994), "Molecular genetics of auxin and cytokinin", *Plant Molecular Biology*, 26: 1499- 1519.

Hood E. E., Requesens D. V., Eversole K. A. (2012), "Regulatory issues of biotechnologically improved plants". *Plant Biotechnology and Agriculture*, 541-550.

Huang J. W., Chen J. T., Yu W. P., Shyur L. F., Wang A. Y., Sung H. Y., Su J. C. (1996), "Complete structures of three rice sucrose synthase isogenes and differential regulation of their expressions", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60(2), 233-239.

ISAAA (2019), "Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2019", *ISAAA Brief No. 55,* ISAAA, Ithaca, NY.

Jansen A., Verstrepen K. J. (2011), "Nucleosome Positioning in Saccharomyces cerevisiae", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75, 301-320.

Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. (1987), "GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants", *The EMBO journal*, 6(13), 3901-3907.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012) "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", *Science*, 337(6096), 816-821.

Johnson E. E. (2020), "*Plant tissue culture: A home-based guide*".

Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A. (2016), "Genetically modified (GM) crops: milestones and new advances in crop improvement", *Theoretical and Applied Genetics*, 129(9), 1639-55.

Kempken F., Jung C. (2010), "Genetic Modification of Plants", Springer Berlin, Heidelberg.

Kikowska M., Włodarczyk A., Stochmal A., Żuchowski J., Thiem B. (2019). "Pentacyclic triterpenoids and polyphenols accumulation in cell suspension culture of (Thunb.) Lindl. ex Spach". *Herba Polonica*, 65(1), 1-11.

Lateef D. D. (2015), "DNA marker technologies in plants and applications for crop improvements", *Journal of Biosciences and Medicines*, 3(05), 7.

Li Q., Song J., Peng S., Wang J. P., Qu G. Z., Sederoff R. R., Chiang V. L. (2014), "Plant biotechnology for lignocellulosic biofuel production", *Plant Biotechnology Journal*, 12(9), 1174-1192.

Lino J. F., Cancado G. M., Borem A., Gomes W. S., Setova T. A. (2012), "Biosafety and Detection of Genetically modified Organisms". *Transgenic Plants - Advances and Limitations,* InTech, 427-448.

Liu Q., Yang F., Zhang J., Liu H., Rahman S., Islam S., She M. (2021), "Application of CRISPR/Cas9 in crop quality improvement", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4206.

Low L. Y., Yang S. K., Andrew Kok D. X., Ong-Abdullah J., Tan N. P., Lai K. S. (2018), "Transgenic plants: Gene constructs, vector and transformation method", *New visions in plant science*, 41-61.

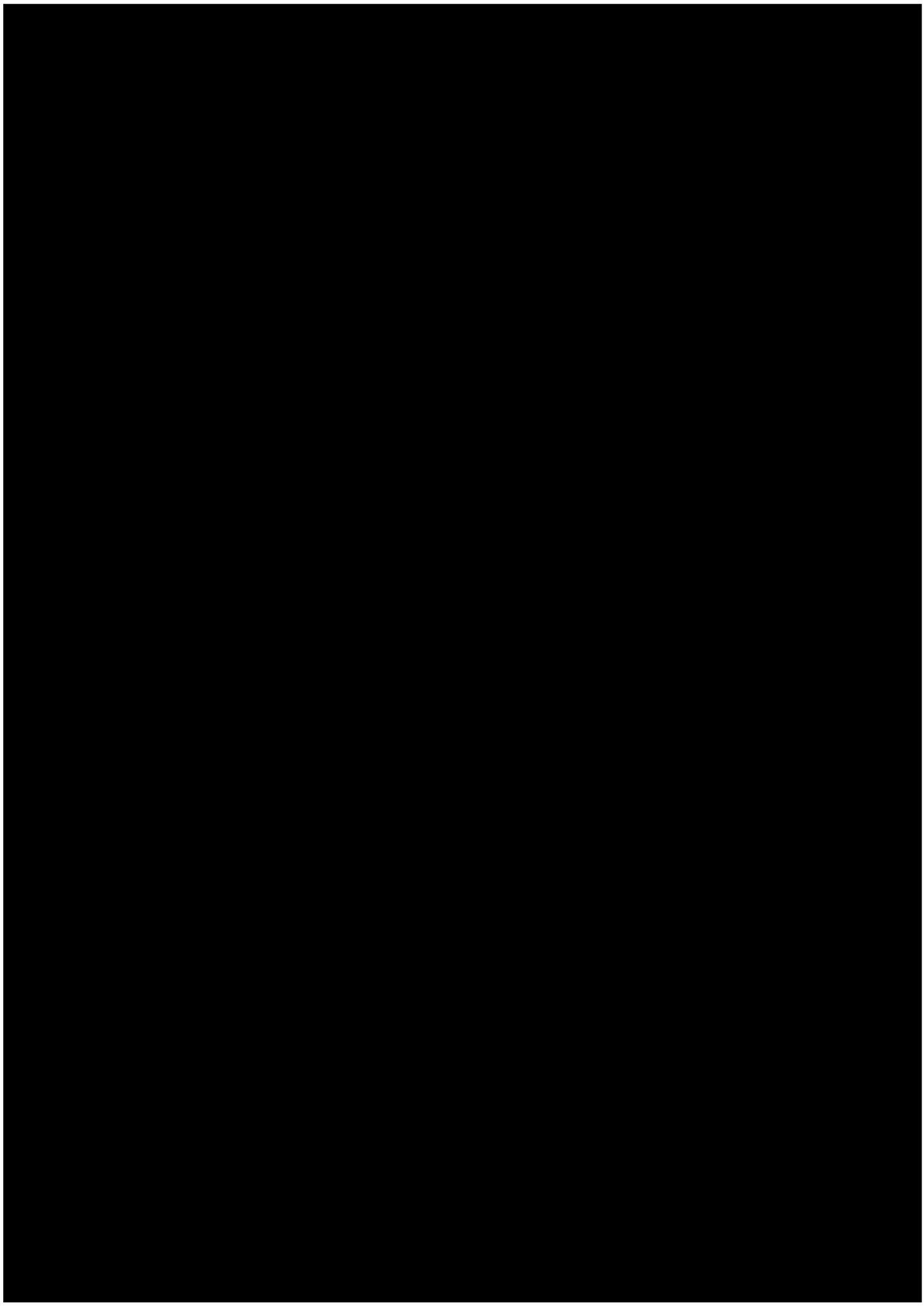
Loyola-Vargas V. M. Vázquez-Flota F. (2006), "*Plant Cell Culture Protocols*", Humana Press Inc., USA.

Loyola-Vargas, V. M., Ochoa-Alejo N. (2018), "An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives", *Plant Cell Culture Protocols*, 3-13.

Mather J. P., Roberts P. E. (2002), "*Introduction to cell and tissue culture theory and technique*", Plenum Press, New York.

Matsuda H., Morikawa T., Ninomiya K., Yoshikawa M. (2001), "Hepatoprotective constituents from zedoariae rhizoma: absolute stereostructures of three new carabrane-type sequiterpenes, curcumenolactones A, B and C", *Bioorga Med Chem,* 9, 909-916.

Matsuda H., Morikawa T., Toguchida I., Ninomiya K., Yoshikawa M. (2001), "Inhibitors of nitric oxide production and new sesquiterpenes, zedoarofuran, 4-epicurcumenol, neocurcumenol, gajutsulactones A, and B, zedoarolodes A and B, from *zedoariae* rhizoma", *Chem Pharma Bull*, 49, 1558-1566.



Paek K. Y., Chakrabarty D., Hahn E. J. (2005). "*Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants*", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81, 287-300.

Park S. (2021), "*Plant tissue culture - Techniques and experiments*", Elsevier.

Prasad B. D., Sahni S., Kumar P., Siddiqui M. W. (2017), "*Plant Biotechnology, Volume 1: Principles, Techniques, and Applications*", CRC Press.

Ranjan A., Khokhani D. (2017), "Scope and importance of plant biotechnology in crop improvement", *Plant Biotechnology*, 1, 27-44.

Razan M. K. (1994), "*An introduction to plant tissue culture*" Oxford & IBH, New Delhi.

Razdan M. K., Cocking E. C. (eds) (2000), "*Conservation of plant genetic resources in vitro: Applications and limitations*", Vol 2. Oxford and IBH Publishing Co, New Delhi.

Rothstein S. J., Lahners K. N., Lotstein R. J., Carozzi N. B., Jayne S. M., Rice D. A. (1987), "Promoter cassettes, antibiotic-resistance genes, and vectors for plant transformation", *Gene*, 53(2-3), 153-161.

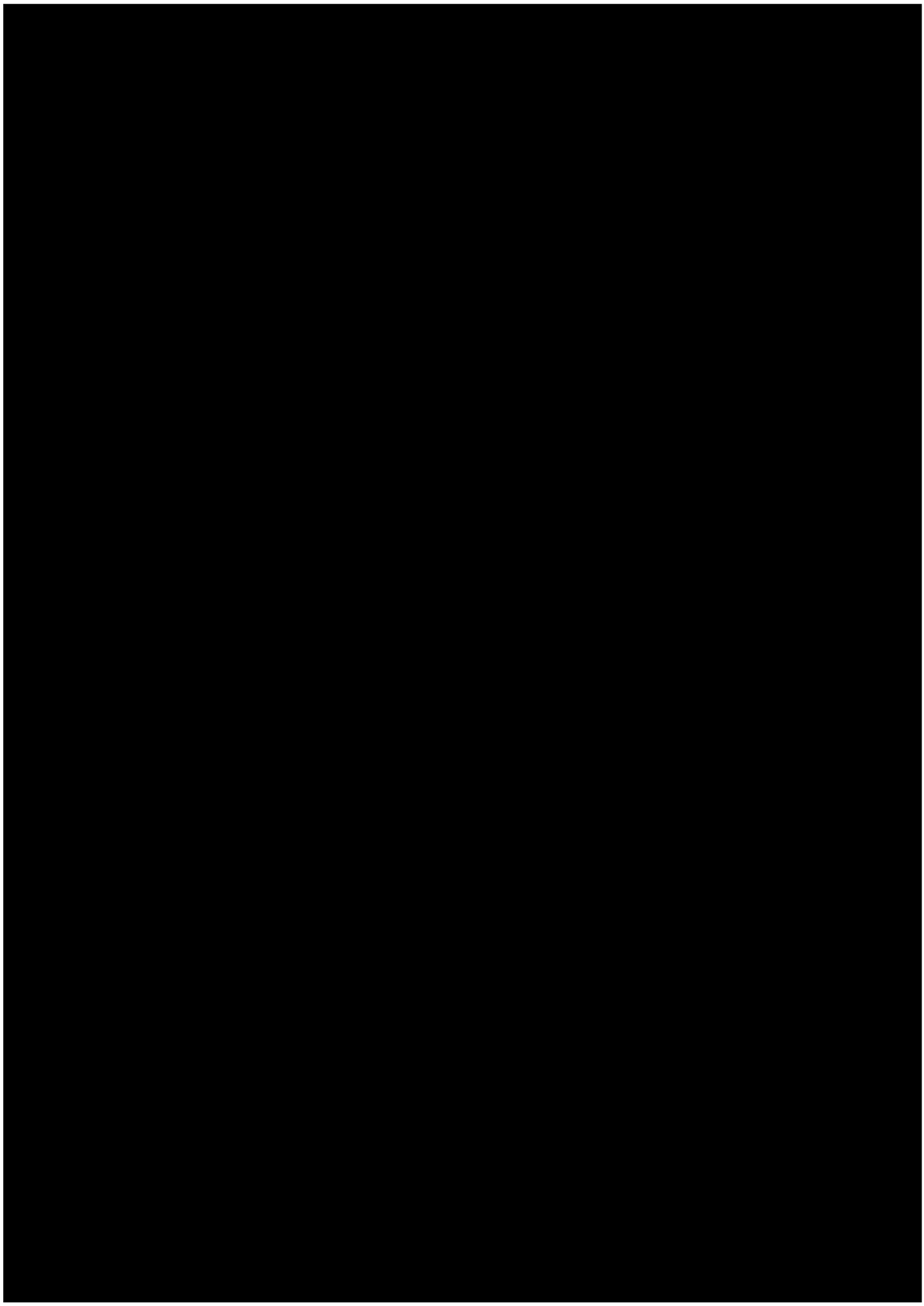
Russell G. E. (1988), "*Biotechnology of higher plants*", Intercept Ltd. Wimborne, Dorset, UK.

Rustgi S., Luo H. (2020), "Biolistic DNA delivery in plants: Methods and Protocols", Humana New York, New York .

Sakai A., Engelmann F. (2007), "Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a critical review", *Cryoletters*, 28:251–172.

Scherhag P., John G. T., Haas C., & Ackermann J. U. (2017). "*Biomass Monitoring in a S. fruticosa Culture: Evaluation of the SFR Vario for Applications in Plant Cell-Suspension Cultures"*. Genetic Engineering & Biotechnology News, 37(8), 24-25.

Schmidt T., Heslop-Harrison J. (1998), "Genomes, genes anf junk: the large-scale organization of plant chromosomes", *Trends in Plant Science*, 3(5), 195-199.



ThermoFisher Scientific, The Basics: RT-PCR, https://www.thermofisher.com/vn/en/home/references/ambion-tech-support/rtpcr-analysis/general-articles/rt--pcr-the-basics.html, 2022.

Trigiano R. N., Gray D. J. (2000), "*Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*", CRC Press, New York.

Tröder S. E., Zevnik B. (2022), "History of genome editing: From meganucleases to CRISPR", *Laboratory Animals*, 56(1), 60-68.

Usha K., Abdin M. Z., Pandey N. K. (2017), "Biosafety, Bioethics, and IPR Issues in Plant Biotechnology", *Plant Biotechnology: Principles and Applications,* Springer, 367-392.

Vasil I. K. (2008), "A short history of plant biotechnology", *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 387-394.

Víctor M., Loyola-Vargas, Ochoa-Alejo N. (2012), "*Plant cell culture protocols*", Springer Nature, Switzerland.

Weaver R. F. (2021), "Molecular Biology (Fifth edition), McGraw-Hill, New York.

Zaidi S. S., Mahas A., Vanderschuren H., Mahfouz M. M. (2020), "Engineering crops of the future: CRISPR approaches to develop climate-resilient and disease-resistant plants", *Genome Biology*, 21, 289.

Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. (1983), "Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity", *The EMBO journal*, 2(12), 2143-2150.

Zhang S., Shen J., Li D., Cheng Y. (2021), "Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing", *Theranostics*, 11(2), 614-648.